ÜBER DIE OXYDATION VON KÄMPFEROL-3-GLUKOSID DURCH PEROXYDASE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietrich Klinge

aus Berlin

1963

ÜBER DIE OXYDATION VON KÄMPFEROL-3-GLUKOSID DURCH PEROXYDASE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietrich Klinge

aus Berlin

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. H. Loth
Prof. Dr. N. Kreutzkamp

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 1963

Tag der Promotion: 24. Juli 1963

Diese Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin bei Herrn Professor Dr. G. Schenck durchgeführt. Das Thema erhielt ich von Herrn Privatdozent Dr. H. Loth.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Schenck, danke ich herzlich für die grosszügige Förderung meines Studiums.

Herrn Dr. Loth bin ich sehr dankbar für viele Ratschläge und sein Interesse an diesen Untersuchungen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	
1. Isolierung von zwei Kämpferol-3-glykosiden aus Aesculus Hippocastanum	6
2. Reinheitsprüfung von Kämpferol-3-glukosid	9
3. Das Spektrum von Kämpferol-3-glukosid	11
4. Veränderungen des Spektrums bei der Oxydation durch Meerrettich-Peroxydase und Wasserstoffperoxyd	14
5. Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Oxydation	20
6. Versuche zur Reduktion intermediärer Oxydationsprodukte	24
7. Papierchromatographische Untersuchung der auftretenden Oxydationsprodukte	25
a) Untersuchung der Oxydationsprodukte in Abhängigkeit von der Oxydationszeit	25
b) Untersuchung der Oxydationsprodukte in Abhängigkeit von der Menge an Oxydationsmittel	28
8. Isolierung und Charakterisierung eines Oxydationsproduktes von Kämpferol-3-glukosid	30
a) Wahl der günstigsten Oxydationsbedingungen	30
b) Präparative Auftrennung des Gemisches der Oxydationsprodukte	31
c) Charakterisierung eines Oxydationsproduktes	34
C. Diskussion der Versuchsergebnisse	42
D. Experimenteller Teil	
1. Isolierung der Kämpferolglykoside	49
a) Extraktbereitung	49
b) Reduktionsprobe	49
c) Isolierung durch Säulenchromatographie	49
d) Identifizierung von Kämpferol-3-rhamnoglukosid	51

e) Identifizierung von Kämpferol-3-glukosid 53

2. Ferment und Pufferlösungen 56

3. Die Oxydation von Kämpferol-3-glukosid durch Meerrettich-Peroxydase und Wasserstoffperoxyd 58

a) Kämpferol-3-glukosidlösung 58

b) Wasserstoffperoxydlösung 58

c) Das Spektralphotometer 59

d) Spektren 59

e) Oxydationsversuche 59

f) Reduktionsversuche 59

4. Papierchromatographie der Oxydationsprodukte 61

5. Isolierung eines Oxydationsproduktes 63

a) Reaktionsansatz 63

b) Säulenchromatographie des Oxydationsgemisches 63

c) Reinigung von Tetrahydrofuran 63

d) Präparative Auftrennung des Oxydationsgemisches 64

6. Untersuchung des Oxydationsproduktes 65

a) Schmelzpunktsbestimmung und Chromatographie 65

b) Elementaranalyse 65

c) Säurehydrolyse 65

d) UV-Spektren 66

e) Azetylierung des Aglukons 66

f) Azetylgruppenbestimmung 67

g) Molgewichtsbestimmung nach RAST 67

h) Molgewichtsbestimmung mit dem Osmometer 68

i) Alkalischmelze des Oxydationsproduktes 69

E. Zusammenfassung 70

F. Literaturverzeichnis 72

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548012_0042

A. Einleitung

Die Ergebnisse der Pflanzenanalyse in den letzten Jahrzehnten haben gezeigt, dass die Flavonoide eine ausserordentlich grosse Verbreitung im Pflanzenreich besitzen. Lediglich die Bakterien und niederen Pflanzen - Algen, Pilze, Flechten und Moose - scheinen nicht zu ihrer Synthese befähigt zu sein (14). Bei den höheren Pflanzen finden sie sich in allen Teilen des Sprosses und der Wurzel (15), wenn auch gewöhnlich grosse Unterschiede in der Art und Menge der einzelnen Verbindungen vorhanden sind.

Bedeutung besitzen einige Flavonoide als Vorstufen von polymeren Verbindungen, die durch die Begriffe "kondensierte Gerbstoffe" und "Phlobaphene" charakterisiert werden können. Kondensierte Gerbstoffe sind wasserlösliche, nicht durch Säure hydrolysierbare höhermolekulare Körper, die die Fähigkeit besitzen, Eiweiss zu fällen. Bei der Lagerung gehen sie durch oxydative Kondensation in die Phlobaphene oder Gerbstoffrote über, die unlöslich sind und keine Gerbwirkung mehr haben.
Gerbstoffe und Phlobaphene beschäftigen die Pharmazeutische und Lebensmittelchemie ebenso wie die Tabakindustrie und die Holzforschung. Ihr Entstehen ist in manchen Fällen unerwünscht, z.B. bei der Lagerung von Fruchtsäften und Tinkturen, für viele andere Prozesse aber unbedingte Voraussetzung. Geschmack und Aroma des Kakaos, des schwarzen Tees und des Tabaks beruhen zum grossen Teil auf dem vielfältigen Gemisch der enthaltenen Gerbstoffe. Bei den holzbildenden Pflanzen machen sie Kernholz und Rinde widerstandsfähig gegen Zersetzung und Fäulnis.
Als Vorstufen der kondensierten Gerbstoffe gelten heute nach übereinstimmender Ansicht vor allem die oxydablen und leicht polymerisierenden Catechine und Leukoanthocyanidinhydrate. Über die Art der Polymerisation und die Verknüpfung der Monomeren miteinander weiss man dagegen noch wenig, und die Meinungen darüber sind sehr verschieden (21).
FREUDENBERG (11), dem die ersten Forschungen auf diesem Gebiet zu verdanken sind, glaubt an eine Selbstkondensation unter Einfluss von Wärme und Säure. Aus Catechinen und Leukoanthocyanidinhydraten erhielt er bei diesen Bedingungen lösliche oligomere

Produkte mit Gerbstoffeigenschaften, die sich dann weiter in nicht lösliche Polymere umwandelten.
HATHWAY und Mitarbeiter (18) vertreten die Theorie der autoxydativen und enzymatischen Polymerisation über chinonartige Zwischenprodukte. Dabei sollen die Monomeren durch C-C-Brücken miteinander verbunden sein. Bei Verwendung von Peroxydase erhielten sie andere Produkte als mit Polyphenoloxydase; nach Vergleich der Spektren dieser Produkte mit den Spektren natürlicher Gerbstoffe sprechen sie der Polyphenoloxydase die entscheidende Rolle bei der Gerbstoffbildung zu.
ROUX und HERGERT (21) betrachten als Vorstufen der kondensierten Gerbstoffe vor allem die Leukoanthocyanidinhydrate. An verschiedenen natürlichen Gerbstoffen versuchen diese Autoren zu beweisen, dass die Monomeren durch Ätherbrücken miteinander verknüpft sein müssen und die 3,4-Dihydroxyflavanstruktur nicht verändert sein kann. Auf einen bestimmten Bildungsmechanismus legen sie sich nicht fest.
Beim Vergleich der drei Theorien mit den Ergebnissen anderer Forscher auf diesem Gebiet, beispielsweise ROBERTS (49), erscheint es begründet, den oxydierenden Fermenten mindestens eine massgebliche Rolle bei der Gerbstoffentstehung zuzuschreiben. Es kommen hier in Frage die Polyphenoloxydasen und die Peroxydasen. Beide sind in fast jedem pflanzlichen Material vorhanden.
Die Wirkung der Polyphenoloxydasen ist augenscheinlicher als die der Peroxydasen. Bekannt sind die Bräunungsreaktionen verletzter Pflanzengewebe, die durch Oxydation phenolischer Körper in Gegenwart von Luftsauerstoff zustande kommen. In der Lebensmitteltechnologie besitzen solche Bräunungsvorgänge grosse Bedeutung; sie werden, wie auch die Prozesse bei der Teefermentation (49), heute überwiegend der Wirkung der Phenoloxydasen zugeschrieben (46).
Die Reaktion der Peroxydasen ist an das Vorhandensein von Wasserstoffperoxyd gebunden. Diese Verbindung findet sich normalerweise nicht im pflanzlichen Gewebe; sie entsteht aber als Nebenprodukt bei der Reaktion einiger Fermente vom Oxydasetyp (39). Dazu gehören die Aminoxydasen, die Glukoseoxydase und vor allem die Glykolsäureoxydase, deren Vorkommen für viele Pflanzen nach-

gewiesen worden ist (4). Die Beteiligung der Peroxydasen an der Gerbstoffbildung erscheint also durchaus denkbar. Einen exakten Beweis für diese Fragen zu erbringen, ist nur schwer möglich; man bemüht sich, an Hand von Modellversuchen Vergleiche mit den sicherlich sehr komplexen natürlichen Vorgängen anzustellen.

Mögliche Substrate für die Peroxydasen sind nicht nur Catechine und Leukoanthocyanidinhydrate, sondern auch alle übrigen Flavonoide, sofern sie nichtsubstituierte phenolische Hydroxylgruppen tragen. Das zeigen Versuche mit einer Anzahl niedermolekularer Phenole (35); in einigen Fällen sind Reaktionsprodukte isoliert worden, die Aufschluss über die Art der Polymerisation bei peroxydasekatalysierten Oxydationen geben.
GROSS und SIZER (16) isolierten Dimere des Tyramins und Tyrosins (Abb. 1), die nach ihren Untersuchungen durch C-C-Verknüpfung in 3-Stellung miteinander verbunden sind. Als Zwischenstufen nehmen sie Radikale an, die durch Dehydrierung der Hydroxylgruppen entstehen und anschliessend dimerisieren. Neben den Dimeren wurden auch Trimere und höhermolekulare Oxydationsprodukte nachgewiesen.

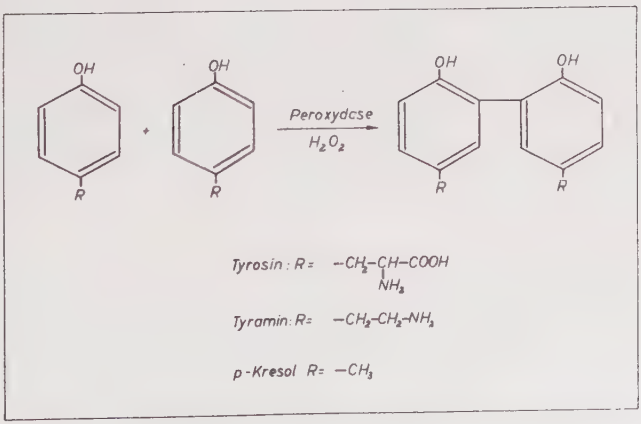

Abb. 1

In ähnlicher Weise hatten schon WESTERFELD und LOWE (56) Di- und Trimere bei der Oxydation des p-Kresols gefunden. Auch hier waren die Monomeren durch C-C-Brücken in 3-Stellung miteinander verknüpft (Abb. 1). Diese Angaben werden gestützt durch Versuche von KOLESNIKOW und PETROCHENKO (32), die die Bildung freier Radikale bei der p-Kresol-Oxydation für erwiesen halten.

Solche speziellen Untersuchungen über peroxydasekatalysierte Oxydationen sind bei Flavonoiden nur selten durchgeführt worden; definierte Oxydationsprodukte wurden bisher nicht isoliert. Neben den erwähnten Versuchen HATHWAYS an Catechinen sind die Untersuchungen von NEUBERG und KOBEL (42) am Rutin von Interesse. Bei der Einwirkung eines Fermentpräparates aus Tabakblättern auf Rutin beobachteten sie die Bildung von löslichen braunen Substanzen. Bei Zugabe von Wasserstoffperoxydlösung trat verstärkte Braunfärbung auf; demnach waren nicht nur die in der Fermentpräparation enthaltenen Phenoloxydasen, sondern auch Peroxydasen an der Reaktion beteiligt.
Auch MIKHAILOV (37) stellte fest, dass Rutin durch Peroxydase-H_2O_2 zu braungefärbten Produkten oxydiert wird.
Vor kurzem untersuchte LOTH (34) die Oxydation des Rutins durch Meerrettich-Peroxydase-H_2O_2 auf spektralphotometrischem und papierchromatographischem Wege. Er erbrachte den Nachweis für eine Chinonbildung des Rutins mit anschliessender Polymerisatio zu höhermolekularen braunen Produkten. Chinonbildung und Polymerisation zeigten Analogien zur Oxydation des Brenzcatechins in wässeriger Lösung. Offenbar werden die Phenolhydroxyle des Rutinseitenringes bevorzugt durch Peroxydase angegriffen; bei der nachfolgenden Polymerisation stände die Verknüpfung der Phenylseitenringe dann im Vordergrund.

Auf dem Wege der weiteren Erforschung dieses Gebietes war es naheliegend, neben den im Seitenring doppelt hydroxylierten Flavonoiden, zu denen das Rutin gehört, auch die einfach hydroxylierten zu untersuchen. Diese Reihe von Flavonoiden tritt zwar mengenmässig hinter den doppelt hydroxylierten zurück, besitzt aber eine ähnlich grosse Verbreitung.
Um bessere Vergleichsmöglichkeiten mit den beim Rutin erhaltenen

Ergebnissen zu schaffen, wurde ebenfalls ein Flavonol als Untersuchungsobjekt gewählt. Es war das Kämpferol, das 3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon, das sich nur durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe vom Quercetin, dem Aglukon des Rutins, unterscheidet (Abb. 2).

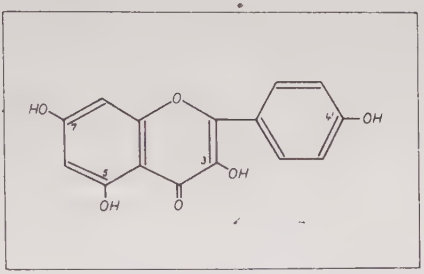

Abb. 2

Da Kämpferol in Wasser praktisch unlöslich ist, die fermentative Oxydation aber nur in wässeriger Lösung ablaufen kann, musste ein wasserlösliches Derivat verwendet werden. In Analogie zum Rutin entschieden wir uns für ein 3-Glykosid; eine solche Verbindung entsprach ausserdem den Verhältnissen in der Pflanze, die Flavonoide gewöhnlich in glykosidisch gebundener Form enthält.

B. Allgemeiner Teil

1. Isolierung von zwei Kämpferol-3-glykosiden aus Aesculus Hippocastanum

Kämpferol selbst und seine Glykoside und Methylderivate sind häufige Inhaltsstoffe vieler Pflanzen (29); besonders weisse Blütenblätter scheinen reich an diesen Verbindungen zu sein (50). Seltener finden sich jedoch Kämpferol-3-glykoside, vor allem in einheimischen Gewächsen und in Mengen, bei denen eine präparative Gewinnung lohnend ist.

1959 veröffentlichten HÖRHAMMER und Mitarbeiter eine Untersuchung über die Flavonglykoside der Blüten und Blätter der Rosskastanie, Aesculus Hippocastanum L. (22). Aus beiden Pflanzenteilen wurde eine Reihe von Kämpferol- und Quercetinglykosiden in guter Ausbeute isoliert und identifiziert. Die grünen Blätter enthielten überwiegend Quercetinglykoside, die Blüten vor allem Kämpferolglykoside. Das Hauptflavon der Blüten war Kämpferol-3-glukosid; daneben fanden sich Kämpferol-3-arabinosid, Kämpferol-3-rhamnoglukosid und in geringer Menge zwei Quercetinglykoside. Diese Angaben ermunterten uns zur Isolierung eines Kämpferol-3-glykosids aus Rosskastanienblüten. Wir versuchten anfänglich, nach der von HÖRHAMMER beschriebenen Methode zu arbeiten, hatten aber grosse Schwierigkeiten bei der Trennung der Glykoside voneinander. Durch Anwendung der Säulenchromatographie mit geeigneten Adsorbentien liess sich dieses Problem dann erfolgreich lösen. Das neue Verfahren ergab sehr gute Ausbeuten an reinen Glykosiden, da lediglich bei der Umkristallisation geringe Verluste eintraten.

Die getrockneten Blütenstände wurden von den Stielen befreit und mit heissem Methanol extrahiert. Wir erhielten einen braungrünen Auszug, der von den Blütenrückständen abgepresst und im Vakuum bis zum dicken Extrakt eingeengt wurde. Dieser Extrakt wurde mit heissem Wasser digeriert; dabei schieden sich Chlorophyll und fettartige Verunreinigungen ab und wurden anschliessend durch Filtrieren entfernt.

Die nun vorliegende klare braune Lösung, aus der HÖRHAMMER und Mitarbeiter die Flavonglykoside durch fraktioniertes Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln isoliert hatten, wurde abweichend davon durch Polyamidchromatographie weiter verarbeitet.

Die Verwendung von Polyamidpulver als Adsorbens bei der Säulenchromatographie ist in letzter Zeit mehrfach beschrieben worden. Besonders auf dem Gebiet der Phenole und hier vor allem der Flavonoide und Gerbstoffe wurden Trennungen und Reinigungseffekte erzielt. Einmal konnten Flavonoide von Begleitstoffen nichtflavonoider Natur abgetrennt werden (25, 41); zum anderen wurden verschiedene Flavonoide voneinander und Flavonaglukone von -glykosiden getrennt (41, 23, 55).
In Anlehnung an diese Verfahren (26) wurde die Isolierung der Kämpferolglykoside aus dem vorgereinigten Extrakt in zwei Stufen durchgeführt:

a) Reinigung von Begleitstoffen
b) Trennung der Glykoside

a) Die wässerige Flavonlösung, die noch grössere Mengen von gerbstoffartigen Polymeren und Zuckern enthielt, wurde über eine wassergesättigte Polyamidsäule gegeben und längere Zeit mit Wasser eluiert. Dabei gingen Zucker und andere gut wasserlösliche Substanzen in das Eluat, während die phenolischen Bestandteile, vor allem Flavone und Gerbstoffe, vom Polyamid adsorbiert wurden. Nun wurde mit Methanol eluiert, wobei sich die Flavone ablösten, nicht jedoch die Gerbstoffe, die infolge stärkerer Adsorption nur wenig weiterwanderten. Das methanolische Eluat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Es blieb ein gelbbrauner Rückstand, der überwiegend aus dem Gemisch der Flavonglykoside bestand.
b) Dieses Gemisch wurde durch nochmalige Polyamidchromatographie, wobei reines Methanol als Entwicklungsphase diente, in einzelne Fraktionen getrennt.
Durch Vereinigung der zu den beiden Hauptzonen gehörenden Fraktionen, anschliessendes Eindampfen und mehrfaches Umkristallisieren wurden zwei Kämpferol-3-glykoside in ausreichender Menge erhalten.

Wie die Untersuchung ergab, war das in grösserer Ausbeute angefallene Produkt Kämpferol-3-glukosid, hellgelbe feine Kristalle vom Schmelzintervall 172 - 176° C. Das zweite, in geringerer Menge erhaltene Glykosid wurde als Kämpferol-3-rhamnoglukosid identifiziert, gelbe Kristalle vom Schmelzintervall 184 – 186° C. Für die in der folgenden Arbeit beschriebenen Oxydationsversuche wurde lediglich das Kämpferol-3-glukosid verwendet. Es wurde einer genauen Reinheitsprüfung unterworfen, um Irrtümer bei den Oxydationsversuchen zu vermeiden.

2. Reinheitsprüfung von Kämpferol-3-glukosid

Das erhaltene Kämpferol-3-glukosid zeigte bei der papierchromatographischen Prüfung mit den Laufmittelsystemen Essigester-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) und Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) einheitliche Flecken; selbst beim Auftragen grösserer Mengen (100 - 300 γ) fanden sich keine Verunreinigungen.
Das Schmelzintervall von 172 - 176° C (KOFLER) stimmte mit dem von HÖRHAMMER erhaltenen (173 - 175° C) gut überein. Bei weiterem Erhitzen über den Schmelzpunkt hinaus erstarrte die Substanz jedoch wieder und schmolz endgültig bei 218 - 220° C. Dieser höhere Schmelzpunkt muss dem kristallwasserfreien Produkt zugeordnet werden, wie Versuche mit getrocknetem Kämpferol-3-glukosid zeigten.
Die Bestimmung des Kristallwassergehaltes ergab einen Wert von 4,07 %. Das ist ein Drittel des von HÖRHAMMER gefundenen Gehaltes von 11,8 % und entspricht 1 Mol Kristallwasser / Mol Kämpferol-3-glukosid (theoretischer Wert: 3,86 %). Auch von HATTORI (19) wird ein Kristallwassergehalt von 1 Mol angegeben.
Der Aglukongehalt der kristallwasserfreien Substanz entsprach mit 63,87 % dem theoretischen Wert von 63,83 %.

Bemerkenswert erschien die Differenz im Kristallwassergehalt zwischen der von HÖRHAMMER isolierten und unserer Substanz, obwohl die Schmelzpunkte übereinstimmten. Wir vermuteten einen Einfluss des Lösungsmittels bei der Umkristallisation: HÖRHAMMER hatte das Glykosid aus Azeton-Wasser (1+1) umkristallisiert, während wir Äthanol-Wasser (1+1) verwendeten, da Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln eine bessere Kristallisation daraus ergeben hatten.
Zur Überprüfung dieser Frage kristallisierten wir einen Teil der Substanz aus Azeton-Wasser (1+1) um. Die dabei erhaltenen Kristalle verloren bei der Trocknung 4,06 % Wasser und schmolzen bei 172 - 176° C; sie zeigten also gleiches Verhalten wie das Äthanol-Wasser-Kristallisat.
Eine Erklärung für die Differenz der Kristallwassergehalte kann demnach bisher nicht gegeben werden, vor allem, da auch die beiden japanischen Autoren, die nähere Angaben über Kämpferol-3-

glukosid machen, NAKABAYASHI (40) und KISHIMOTO (30), einen Kristallwassergehalt nicht beschreiben. Der von KISHIMOTO angegebene Schmelzpunkt von 206 - 207° C könnte sich auf eine kristallwasserfreie Substanz beziehen.

3. Das Spektrum von Kämpferol-3-glukosid

Kämpferol-3-glukosid weist die für alle Flavonolglykoside charakteristische Lichtabsorptionskurve auf, die durch zwei Maxima und ein Minimum gekennzeichnet ist (Abb. 3). Bei Verwendung eines modernen Spektralphotometers lässt sich ein weiteres Maximum bei 209 nm ausmessen.

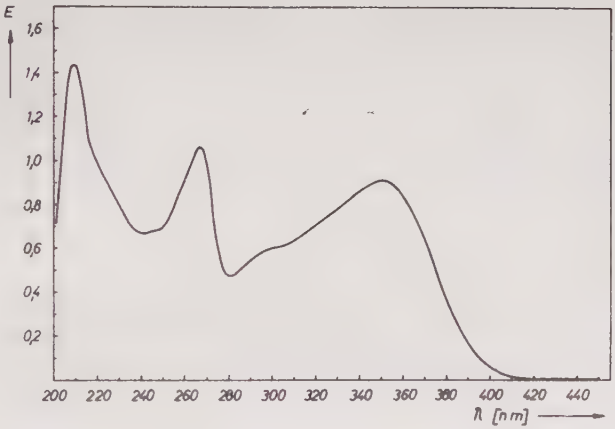

Abb. 3 Spektrum von Kämpferol-3-glukosid
Konzentration: 5 µMol / 100 ml Methanol

Die Lage der Maxima sowie die Werte der speziellen Extinktion in ihnen, verglichen mit den von HÖRHAMMER und von HATTORI (19) angegebenen Werten, zeigt Tabelle 1. Die Unterschiede bei den speziellen Extinktionskoeffizienten sind auf die voneinander abweichenden Kristallwassergehalte zurückzuführen; es wurden deshalb ausserdem die molaren Extinktionskoeffizienten berechnet und die Werte von HÖRHAMMER entsprechend ergänzt. Beim Vergleich dieser Werte ergeben sich nur geringfügige Abweichungen, die innerhalb der Wäge- und Messgenauigkeit liegen.
Für die durchzuführenden Oxydationsversuche wurde das Spektrum ausserdem in wässerigen Pufferlösungen von pH 3 - 7 aufgenommen (Abb. 4). Das dritte kurzwellige Maximum musste hierbei

	HÖRHAMMER	HATTORI	eigene Werte
1. Maximum	347 nm	351 nm	350 nm
$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	35,7		38,9
ε [Liter/Mol.cm]	$17,9.10^3$		$18,1.10^3$
2. Maximum	265 nm	267 nm	266 nm
$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	42,6		45,0
ε [Liter/Mol.cm]	$21,4.10^3$		$21,0.10^3$
3. Maximum			209 nm
$E^{1\,\%}_{1\,cm}$			61,6
ε [Liter/Mol.cm]			$28,7.10^3$

Tab. 1

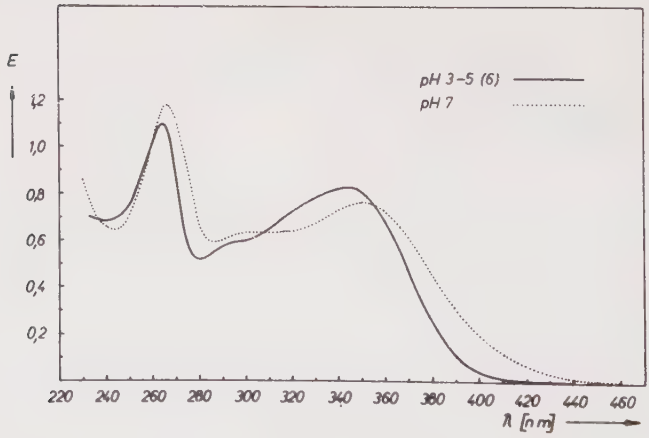

Abb. 4 Spektrum von Kämpferol-3-glukosid in wässerigen Pufferlösungen von pH 3 - 7
Konzentration: 5 µMol / 100 ml

ausser Betracht bleiben, da die Durchlässigkeit der Lösungen in diesem Bereich infolge der starken Absorption der Puffersubstanzen zu gering war. In diesen Lösungen verschieben sich sowohl Lage als auch Höhe der Maxima gegenüber der alkoholischen Lösung (Tab. 2).

	1. Max.	2. Max.	1. Min.	2. Min.
Methanol	350	266	280	240
pH 3 - 5	345	264	280	238
pH 6	345	265	282	240
pH 7	350	266	286	243

Tab. 2 Verschiebung der Maxima und Minima in verschiedenen Pufferlösungen
Werte von λ in nm.

Während das Spektrum im sauren Bereich von pH 3 - 5 praktisch unverändert bleibt, zeigt sich beim pH 6 eine sehr geringe, beim pH 7 eine stärkere bathochrome Verschiebung, verbunden mit einer Vergrösserung der Extinktion im Kurzwelligen und einer Verkleinerung im Langwelligen.
Unabhängig vom pH-Wert sind die beiden kurzwelligen Absorptionsbanden schmal, aber stark ausgeprägt, während das langwellige Maximum breit, aber viel schwächer ist (Abb. 3).

4. Veränderungen des Spektrums bei der Oxydation durch Meerrettich-Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

Ausgehend von den Arbeiten von LOTH (34) am Rutin, dem Rhamnoglukosid des Quercetins, wurde versucht, die oxydativen Veränderungen des Kämpferol-3-glukosids spektrophotometrisch zu untersuchen.
Zunächst musste die Frage geklärt werden, ob Kämpferol-3-glukosid von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd überhaupt verändert wird. Für die Versuche kam der pH-Bereich zwischen 3 und 7 in Frage, da im stärker sauren Gebiet mit Inaktivierung der Peroxydase, im alkalischen mit Autoxydation des Kämpferol-3-glukosids gerechnet werden musste.
Blindversuche, wobei wässerige Kämpferol-3-glukosidlösungen mit nur einem der beiden Partner des Oxydationssystemes, Peroxydase oder Wasserstoffperoxyd, versetzt worden waren, hatten in diesem pH-Bereich über 24 Stunden keine Veränderungen des Spektrums ergeben.
Darauf wurde die Glykosidlösung mit beiden Partnern versetzt. Als das Spektrum nach einiger Zeit gemessen wurde, zeigten sich erhebliche Veränderungen; Kämpferol-3-glukosid liess sich also durch Peroxydase-H_2O_2 oxydieren.
Die weiteren Versuche wurden mit bestimmten Mengen Peroxydase und Wasserstoffperoxyd durchgeführt. Einem 100 ml-Ansatz wurden jeweils $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase und 1 bis 6 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd hinzugefügt. Dabei entsprach 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2 dem Übergang eines Elektrons und war bezogen auf die molare Menge von Kämpferol-3-glukosid.

Zuerst wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion festgestellt. Die Ansätze in Pufferlösungen verschiedener Wasserstoffionenkonzentration wurden mit 5 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 versetzt und solange reagieren gelassen, bis sich die Spektren nicht mehr änderten. Dieser Zustand war nach etwa zwei Stunden erreicht. Die neuen Spektren zeigten auffällige Abnahmen der Extinktion, vor allem in den beiden Maxima; deshalb wurden diese Extinktionsabnahmen als Masstab für die oxydative Veränderung gewählt. In Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen, gaben sie

ein Bild des Reaktionsverlaufes (Abb. 5 und 6).

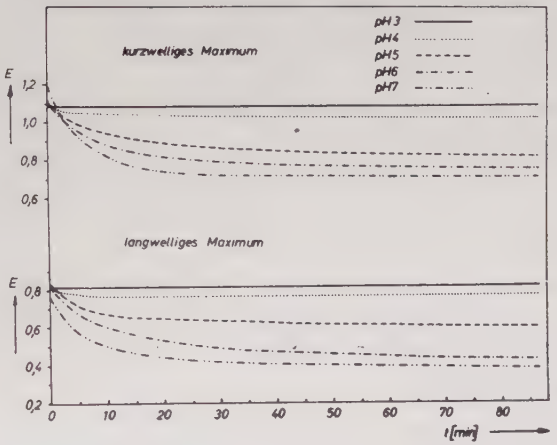

Abb. 5 Extinktionsabnahme in den beiden Maxima bei verschiedenen pH-Werten unter Einwirkung von 5 Ox.-Val. H_2O_2 und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase

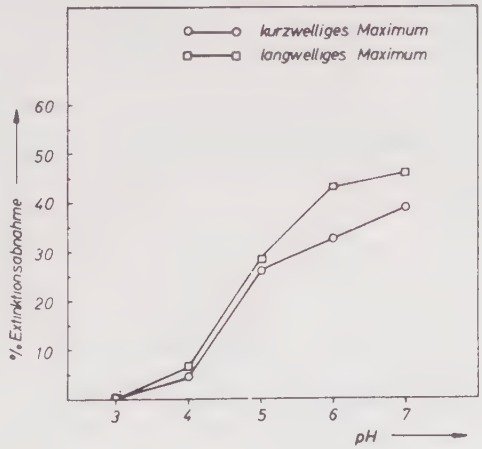

Abb. 6 Prozentuale Abnahme der Extinktionen in den Maxima bei verschiedenen pH-Werten nach Einwirkung von 5 Ox.-Val. H_2O_2 und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase

Beim pH 3 tritt mit Peroxydase-H_2O_2 keinerlei Veränderung ein; die Spektren vor und nach zweistündiger Oxydation sind völlig identisch miteinander. Auch nach längerer Einwirkung des Oxydationssystemes über 24 Stunden konnten keine Veränderungen beobachtet werden.
Beim pH 4 ist eine sehr geringe Abnahme der Extinktionen und somit Oxydation nachweisbar.
Starke Oxydationserscheinungen zeigen sich dann bei pH 5, 6 und 7, wobei ein deutlicher Anstieg der Oxydation bis zum pH 7 zu bemerken ist.
Bei den pH-Werten 4 und 5 tritt im Laufe der Reaktion - bei der von uns verwendeten Fermentkonzentration während der ersten Minuten - eine weissliche Trübung auf, die im pH 4 sehr schwach, im pH 5 jedoch deutlich wahrnehmbar ist. Diese Trübung lässt sich auf ein Ausfallen der bei der Oxydation gebildeten Produkte infolge Unlöslichkeit bei den verwendeten Konzentrationen zurückführen. Da die Löslichkeit von Phenolen mit steigendem pH-Wert infolge Phenolatbildung zunimmt, kann das Klarbleiben der Lösungen beim pH 6 und 7 eventuell damit erklärt werden. In jedem Fall müssen die Trübungserscheinungen beim Betrachten der Abbildungen 5 und 6 berücksichtigt werden, da die für pH 4 und 5 verzeichneten Werte trotz Trübung spektralphotometrisch ermittelt wurden und demnach nur Anhaltspunkte darstellen können.
Wegen der Trübungserscheinungen wurden die weiteren spektralphotometrischen Untersuchungen nur bei den pH-Werten 6 und 7 durchgeführt.
Kämpferol-3-glukosidlösungen dieses pH-Bereiches ergaben nach der Oxydation mit 5 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 Spektren, die völlig uncharakteristisch sind (Abb. 7). Maxima und Minima des Kämpferol-3-glukosids sind ausgeglichen oder ganz verschwunden, vor allem im langwelligen Bereich. Auch das wegen der Absorption der Puffersubstanzen hier nicht messbare sehr kurzwellige Gebiet mit dem 3. Maximum ist nivelliert, wie Versuche an ungepufferten Lösungen zeigten. Nach Zusatz von weiterem Wasserstoffperoxyd über 5 Oxydationsäquivalente hinaus veränderten sich die Spektren nicht mehr.
Wir untersuchten darauf die Spektren von Lösungen, die mit ge-

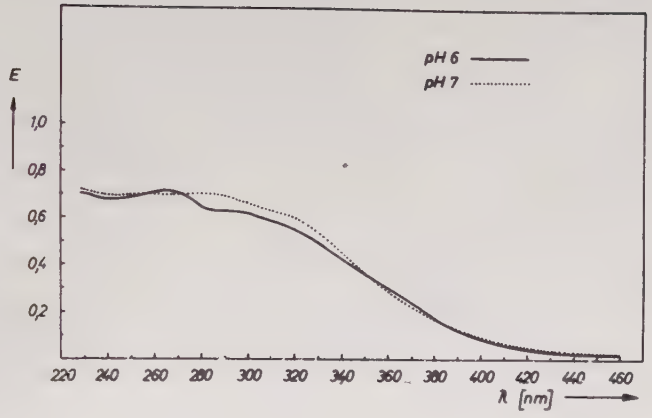

Abb. 7 Absorptionsspektren vollständig oxydierter Kämpferol-3-glukosidlösungen bei pH 6 und 7

ringeren Mengen von Wasserstoffperoxyd - 1 bis 5 Oxydationsäquivalenten - versetzt worden waren. Beim gemeinsamen Auftragen dieser Spektren ergaben sich die Kurvenscharen der Abbildungen 8 und 9. Sie zeigen, dass das Spektrum des Kämpferol-3-glukosids durch Zugabe steigender Mengen H_2O_2 fortschreitend nivelliert wird, wobei die Extinktionen der Maxima geringer, die der Minima grösser werden. Auffallend ist die Tatsache, dass die Schnittpunkte für alle Kurven gleich sind; diese Punkte können als isosbestische Punkte (45) angesehen werden und lassen gewisse Beziehungen zwischen oxydierter und nicht oxydierter Substanz erkennen.

Die Extinktionsdifferenzen in den Maxima sind, nach Beendigung der Reaktion gemessen, den zugesetzten Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd nicht proportional; sie werden mit steigender H_2O_2-Menge kleiner und sind nach Zugabe von mehr als 5 Oxydationsäquivalenten nicht mehr messbar (Abb. 10 und 11). Diese Menge Wasserstoffperoxyd scheint zum vollständigen Ablauf der Reaktion auszureichen, wenigstens soweit sie mit Veränderungen des Spektrums verbunden ist. Aus diesem Grunde wurden alle wei-

teren Messungen nur mit höchstens 5 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 durchgeführt.

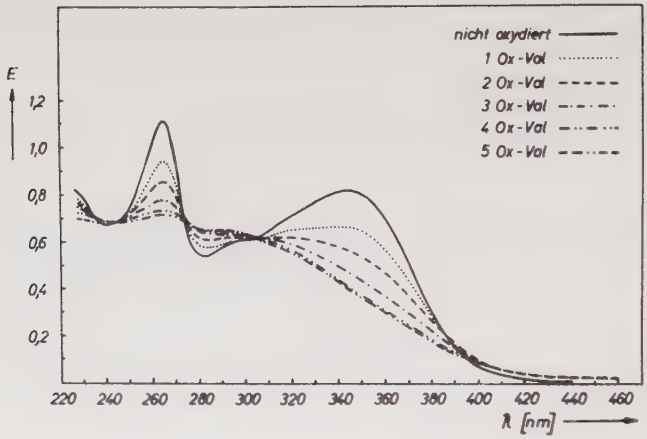

Abb. 8 Spektren von Kämpferol-3-glukosid nach Einwirkung von Peroxydase und 1 - 5 Ox.-Val. H_2O_2 beim pH 6

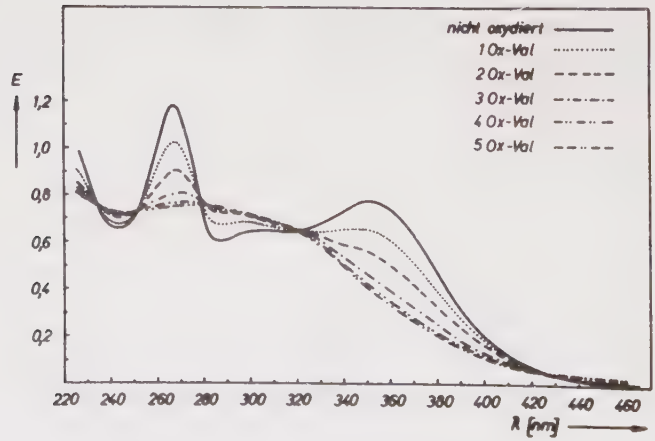

Abb. 9 Spektren von Kämpferol-3-glukosid nach Einwirkung von Peroxydase und 1 - 5 Ox.-Val. H_2O_2 beim pH 7

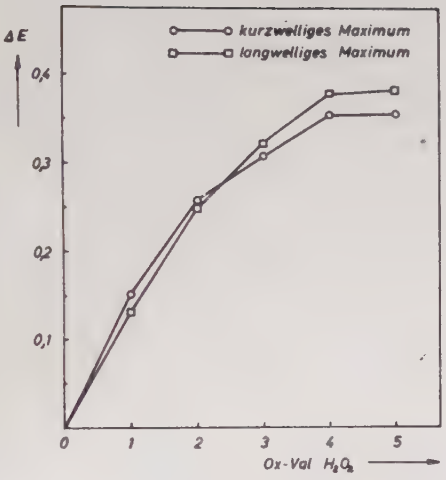

Abb. 10
Extinktionsdifferenzen in den Maxima nach der Oxydation beim pH 6 in Abhängigkeit von den zugesetzten Oxydationsäquivalenten H_2O_2

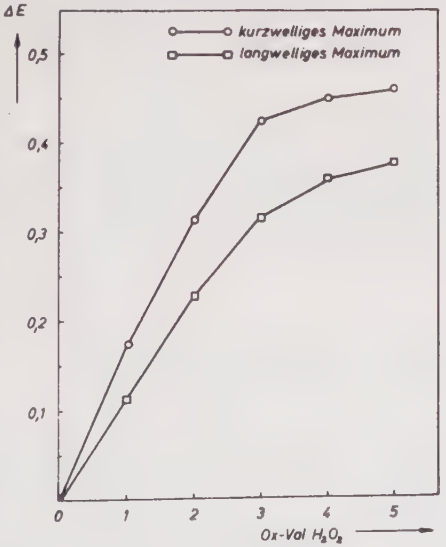

Abb. 11
Extinktionsdifferenzen in den Maxima nach der Oxydation beim pH 7 in Abhängigkeit von den zugesetzten Oxydationsäquivalenten H_2O_2

5. Verfolgung des zeitlichen Verlaufs der Oxydation

Bei den pH-Werten 6 und 7 wurde der zeitliche Verlauf der Oxydation beobachtet. Gemessen wurden die Veränderungen in den beiden Maxima nach Zusatz steigender Mengen Wasserstoffperoxyd. Die Abbildungen 12 bis 15 zeigen die dabei erhaltenen Kurven. Sofort nach Zugabe des Fermentes beginnt sowohl im kurzwelligen als auch im langwelligen Maximum ein steiler Extinktionsabfall, der, je nach der Menge des zur Verfügung stehenden Wasserstoffperoxydes, langsam schwächer wird und nach einiger Zeit zum Stillstand kommt. Bei der von uns verwendeten Fermentkonzentration war der Extinktionsabfall nach durchschnittlich folgenden Zeiten im wesentlichen beendet (Tab. 3):

H_2O_2	pH 6	pH 7
1 Ox.-Val.	7 min.	4 min.
2 Ox.-Val.	18 min.	8 min.
3 Ox.-Val.	35 min.	25 min.
4 Ox.-Val.	120 min.	90 min.
5 Ox.-Val.	etwa 10 Stunden	etwa 6 Stunden

Tab. 3

Bei 1 bis 3 Oxydationsäquivalenten ist also ein deutliches Ende der Reaktion nach kürzerer Zeit zu erkennen, während bei 4 und 5 Oxydationsäquivalenten erst nach mehreren Stunden Stillstand eintritt. In dieser Zeit ist der Extinktionsabfall jedoch sehr gering und kaum noch messbar.

Ein auffälliges Verhalten zeigt das kurzwellige Maximum bei der Oxydation mit 1 bis 3 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd: Hier folgt dem anfänglichen Extinktionsabfall ein Wiederanstieg, der kurz nach dem Abfall am starksten ist, sich dann abschwächt und bis etwa 120 Minuten nach Reaktionsbeginn anhält. Der Wiederanstieg der Extinktion ist allerdings im Vergleich zum Abfall sehr gering, er beträgt nur ca. 1/20 seines Wertes.

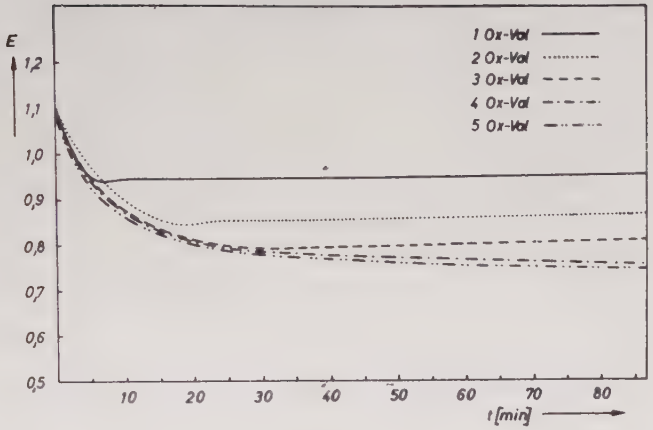

Abb. 12 Oxydation von Kämpferol-3-glukosid beim pH 6. Extinktionsänderung im kurzwelligen Maximum bei verschiedenen H_2O_2-Mengen und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase.

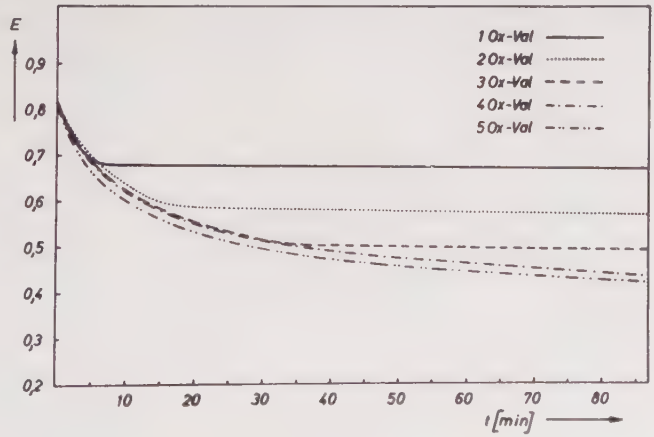

Abb. 13 Oxydation von Kämpferol-3-glukosid beim pH 6. Extinktionsänderung im langwelligen Maximum bei verschiedenen H_2O_2-Mengen und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase.

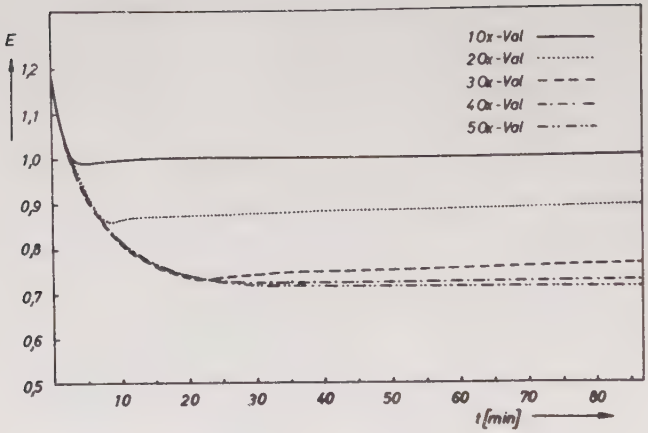

Abb. 14 Oxydation von Kämpferol-3-glukosid beim pH 7. Extinktionsänderung im kurzwelligen Maximum bei verschiedenen H_2O_2-Mengen und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase.

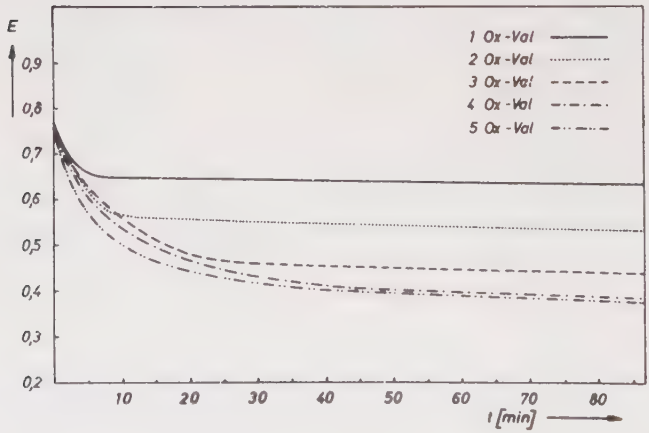

Abb. 15 Oxydation von Kämpferol-3-glukosid beim pH 7. Extinktionsänderung im langwelligen Maximum bei verschiedenen H_2O_2-Mengen und $6{,}9.10^{-10}$ Mol Peroxydase.

Durch Änderung der Fermentkonzentration wurde versucht, die Grösse des Wiederanstiegs im kurzwelligen Maximum zu beeinflussen; es war jedoch keine Abhängigkeit festzustellen (Abb. 16).

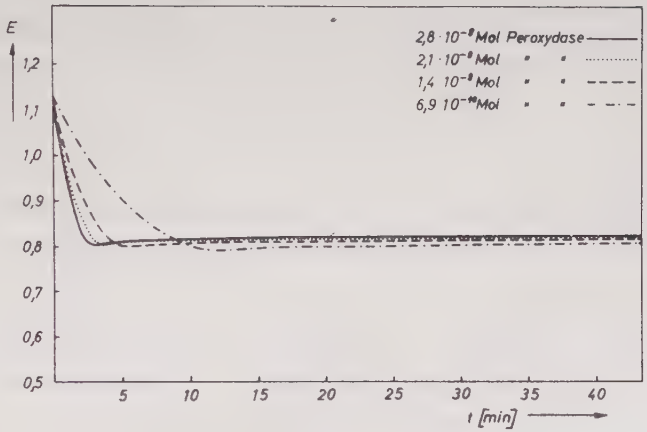

Abb. 16 Oxydation von Kämpferol-3-glukosid beim pH 7. Extinktionsänderung im kurzwelligen Maximum bei verschiedenen Fermentmengen und 2 Ox.-Val. H_2O_2.

6. Versuche zur Reduktion intermediärer Oxydationsprodukte

LOTH konnte spektralphotometrisch zeigen, dass sich das bei der Rutinoxydation als Intermediärprodukt entstehende Chinon wieder zum Rutin reduzieren liess. Diese Reduktion war nachweisbar durch den Wiederanstieg des langwelligen Maximums bei Zusatz eines Reduktionsmittels zu den Ansätzen, nachdem die Oxydation eingeleitet war. Als Reduktionsmittel wurden Titantrichlorid und Ascorbinsäure verwendet.

In ähnlicher Weise wurde geprüft, ob auch bei der Oxydation des Kämpferol-3-glukosids Verbindungen entstehen, die sich durch Ascorbinsäure wieder reduzieren lassen. Die Ansätze wurden bei pH 6 und 7 durchgeführt. Das Oxydationsmittel Wasserstoffperoxyd wurde in Mengen von 1, 3 und 5 Oxydationsäquivalenten der Kämpferol-3-glukosidlösung hinzugefügt. Nach Einleitung der Oxydation durch Fermentzugabe wurden in Abständen von 20 Sekunden gleichmässige Proben entnommen und mit gleich grossen Mengen Ascorbinsäurelösung vermischt. Die Ascorbinsäure befand sich in diesen Proben in einem Überschuss von 100 Reduktionsäquivalenten gegenüber 5 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd und gewährleistete eine vollständige und schnelle Reduktion aller reduzierbaren Anteile. Anschliessend wurden die Proben, die über einen Zeitraum von 30 Minuten nach Beginn der Reaktion entnommen waren, im Spektralphotometer auf ihre Extinktion im langwelligen Maximum geprüft. Die erhaltenen Werte wurden verdoppelt und mit den zu entsprechenden Zeitpunkten gemessenen Extinktionen nicht reduzierter Lösungen verglichen. Eine Messung der Extinktion im kurzwelligen Maximum war unmöglich, da hier die Absorptionen von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure sehr stark sind und die des Kämpferol-3-glukosids überdecken.

Hierbei zeigte sich, dass die Extinktionen der mit Ascorbinsäure versetzten Lösungen zu allen gemessenen Zeitpunkten ebenso gross waren wie die der nicht mit Ascorbinsäure versetzten Lösungen. Die bei der Oxydation gebildeten Produkte waren demnach nicht wieder zum Kämpferol-3-glukosid reduzierbar.

7. Papierchromatographische Untersuchung der auftretenden Oxydationsprodukte

Um einen Überblick über die bei der fermentativen Oxydation entstehenden Produkte zu bekommen, wurden oxydierte Lösungen papierchromatographisch untersucht.
Als geeignetes Laufmittel erwies sich nach mehreren Versuchen das einphasige PARTRIDGE-Gemisch in der Zusammensetzung Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+1) (36).
Die Oxydation des Kämpferol-3-glukosids wurde in wesentlich konzentrierteren Lösungen durchgeführt als bei der spektrophotometrischen Untersuchung. Das war notwendig, um die aufzutragenden Lösungsmittelmengen, die zudem wässerig waren, möglichst gering zu halten.

a) Untersuchung der Oxydationsprodukte in Abhängigkeit von der Oxydationszeit

Die spektrophotometrischen Messungen hatten eine sich über mehrere Minuten erstreckende Oxydationszeit des Kämpferol-3-glukosids ergeben. Deshalb lag es nahe, die in den Lösungen enthaltenen Stoffe nach verschiedenen Zeiten zu untersuchen und eventuell Übergänge zwischen weniger und mehr oxydierten Produkten aufzufinden.

Zu den Versuchen wurden gepufferte Lösungen vom pH 7 verwendet. Diese Lösungen wurden mit einem Überschuss von 5 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd und wechselnden Fermentmengen versetzt; nach dem Umschwenken und Vermischen wurden über einen Zeitraum von 3 Stunden in bestimmten Abständen gleichmässige Proben entnommen und die enzymatische Reaktion darin zum Stillstand gebracht.
Zur Fermentinhibierung besonders geeignet erschien Kaliumcyanid, das noch in 10^{-5}-molarer Lösung Peroxydase vollständig hemmt (57). Wir verwendeten eine konzentrierte Kaliumcyanidlösung, die nach dem Mischen mit den Reaktionslösungen 3.10^{-2}-molar war und eine schnelle Fermenthemmung gewährleistete.
Von den inhibierten Proben wurden jeweils 0,1 ml, entsprechend

100 γ Kämpferol-3-glukosid, auf Papier aufgetragen und chromatographiert.

Die Chromatogramme (Abb. 17) zeigten, dass während der Behandlung mit einem Überschuss von Wasserstoffperoxyd und Ferment eine zunehmende und schliesslich vollständige Oxydation des Kämpferol-3-glukosids stattfindet.

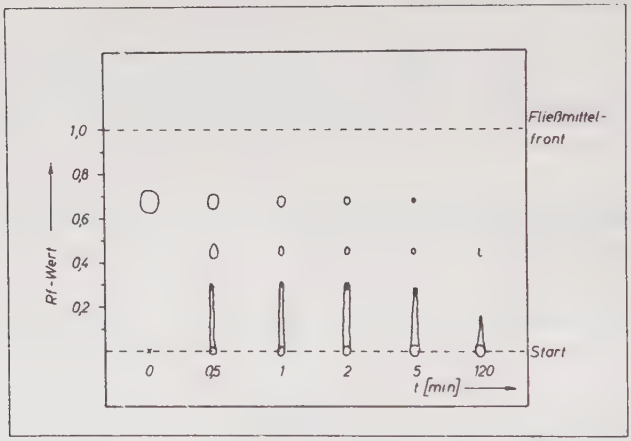

Abb. 17 Chromatogrammschema der Oxydation von Kämpferol-3-glukosid mit 5 Ox.-Val. H_2O_2 und $6{,}9.10^{-9}$ Mol Peroxydase/ 10 ml Reaktionsansatz. Zeitabhängigkeit.

Bei gleicher Ausgangskonzentration des Wasserstoffperoxydes war die Geschwindigkeit der Oxydation abhängig von der Fermentmenge (Tab. 4).
Das Kämpferol-3-glukosid ging bei der Oxydation in mehrere Produkte über, die einen niedrigeren Rf-Wert als das Flavonolglykosid selbst besassen und zum Teil am Startpunkt verblieben. Schärfer umgrenzte Flecken zeigte lediglich ein Produkt, dessen Rf-Wert, aus mehreren Chromatogrammen gemittelt, 0,45 betrug. Die übrigen Oxydationsprodukte bildeten einen Streifen, der sich vom Startpunkt bis etwa zum Rf 0,3 hinzog.
Im Tageslicht waren die Oxydationsprodukte gelb bis gelb-bräun-

Peroxydasemenge auf 10 ml Reaktionsansatz	kein Kämpferol-3-glukosid mehr vorhanden nach
1 ml = $6{,}9.10^{-9}$ Mol	ca. 7 min.
0,4 ml = $2{,}8.10^{-9}$ Mol	ca. 15 min.
0,2 ml = $1{,}4.10^{-9}$ Mol	ca. 60 min.
0,05 ml = $3{,}5.10^{-10}$ Mol	nach 3 Stunden noch in geringer Menge vorhanden

Tab. 4 Abnahme von Kämpferol-3-glukosid bei pH 7 nach Zugabe von 5 Ox.-Val. H_2O_2 in Abhängigkeit von der Fermentmenge.

lich gefärbt; mit Aluminiumchlorid trat im UV-Licht wesentliche Aufhellung, aber keine Fluoreszenz auf.
Es war bei diesen Ansätzen bemerkenswert, dass sich zu keinem Zeitpunkt grössere Mengen der Oxydationsprodukte von mittlerem Rf-Wert fanden. In ungefähr dem Verhältnis, wie diese Produkte bei der Oxydation entstanden, gingen sie in höhermolekulare Substanzen über, die bei der Papierchromatographie am Startpunkt verblieben oder nur wenig wanderten. Nach längerer Oxydationszeit konnten Kämpferol-3-glukosid überhaupt nicht mehr und von den Zwischenprodukten der Oxydation nur noch Spuren gefunden werden.

Andere, im UV-Licht bläulich fluoreszierende Flecken auf den Chromatogrammen konnten den verwendeten Puffersubstanzen zugeordnet werden, wie Vergleichschromatogramme zeigten. Um den Einfluss dieser Substanzen, auch bei der Oxydation, auszuschalten, wurden weitere Ansätze mit rein wässerigen Lösungen durchgeführt. Der pH-Wert der Lösungen war, wie Messungen ergaben, unterschiedlich, wohl als Folge wechselnden CO_2-Gehaltes (38); er lag aber immer zwischen 5 und 6. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich hinsichtlich der Oxydationsprodukte nicht von denen der gepufferten Lösungen.

Auffällig war bei den wässerigen Ansätzen eine bereits wenige Sekunden nach Fermentzugabe auftretende milchige Trübung und

schwache Grün- bis Graufärbung, die sich nach einigen Minuten zu einer weisslichen Färbung abschwächte. Beim Einfliessen der abgenommenen Proben in die Kaliumcyanidlösung lösten sich die Trübungen sofort auf; die zuerst entnommenen Proben färbten die Lösung hellgelb, die später entnommenen gelb bis bräunlich.

Die Bildung einer Trübung in den wässerigen Ansätzen muss auf die ausserordentlich schlechte Löslichkeit der bei der Oxydation entstehenden Produkte bei dem hier vorliegenden pH-Wert zurückgeführt werden. Ähnliches war bereits bei den spektrophotometrischen Messungen beim pH 5 beschrieben worden. Die Auflösung dieser Trübungen in der Kaliumcyanidlösung kann auf die Änderung der H-Ionenkonzentration - die inhibierten Proben besassen einen pH-Wert von etwa 10 - und eine durch Phenolatbildung bedingte Erhöhung der Löslichkeit zurückgeführt werden.

b) Untersuchung der Oxydationsprodukte in Abhängigkeit von der Menge an Oxydationsmittel

Für diese Versuche wurde die pH 7-gepufferte Kämpferol-3-glukosidlösung mit einer bestimmten Fermentmenge versetzt und in gleichmässigen Zeitintervallen je 1/2 bzw. 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd hinzugegeben. Nach jeder Zugabe von Wasserstoffperoxyd wurde die Lösung zum Reaktionsablauf 30 Minuten stehen gelassen, darauf eine Probe entnommen und ohne Fermentinhibierung auf Papier aufgetragen.
Die Fermentinhibierung war hierbei nicht notwendig, da die Reaktion jeweils durch Mangel an Oxydationsmittel abgebrochen wurde.
Es wurden nacheinander bis zu 5 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd zugegeben. Die entwickelten Chromatogramme ergaben folgendes (Abb. 18):
Mit zunehmender Menge an Oxydationsmittel vermindert sich der Anteil nicht oxydierten Kämpferol-3-glukosids; nach Zugabe von 4 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd ist kein Flavonglykosid mehr vorhanden.
Dafür vergrössern sich die Mengen der Oxydationsprodukte mit geringerem Rf-Wert und der am Startpunkt liegenbleibenden Poly-

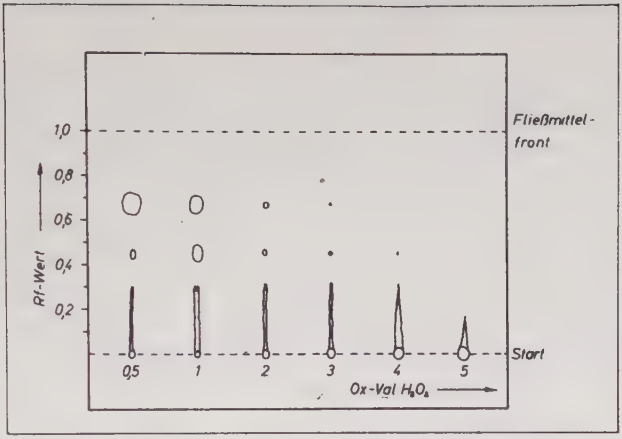

Abb. 18 Chromatogrammschema der Oxydation von Kämpferol-3-glukosid mit verschiedenen Mengen H_2O_2 und $6{,}9.10^{-9}$ Mol Peroxydase/10 ml Reaktionsansatz.

meren. Bei Zugabe von 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd ist ein Maximum der Produkte von mittlerem Rf-Wert vorhanden; vor allem die Substanz vom Rf-Wert 0,45 liegt hier in grösserer Menge vor.
Bei 3 und 4 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 finden sich nur noch geringe Mengen der Produkte von mittlerem Rf-Wert. Nach Zugabe von 5 Oxydationsäquivalenten sind sie ganz verschwunden, und es zeigen sich lediglich braungelbe Flecken, die am Startpunkt liegenbleiben.
Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der Oxydationsprodukte bei begrenzter Menge an Oxydationsmittel wurden mit 1/2, 1 und 2 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 durchgeführt. Inhibiert wurde wieder mit KCN-Lösung. Es zeigte sich, dass bei der angewendeten Fermentkonzentration - $6{,}9.10^{-9}$ Mol Peroxydase/10 ml Reaktionsansatz - die Bildung sämtlicher Oxydationsprodukte sehr schnell ablief: Schon nach etwa 2 Minuten waren sie in maximaler Menge vorhanden. Spätere Veränderungen hinsichtlich ihrer Menge und Verteilung konnten auch bei längerer Reaktionsdauer über 2 Stunden nicht gefunden werden.

8. Isolierung und Charakterisierung eines Oxydationsproduktes von Kämpferol-3-glukosid

Die Tatsache, dass bei der fermentativen Oxydation des Kämpferol-3-glukosids nicht nur hochpolymere Produkte entstehen, sondern dass unter bestimmten Bedingungen auch Zwischenprodukte fassbar sind, regte zur näheren Untersuchung dieser Produkte an.
Dafür war ihre Isolierung und Reindarstellung notwendig. Wie die papierchromatographische Untersuchung gezeigt hatte, war es nicht gelungen, Bedingungen der Oxydation aufzufinden, bei denen es ausschliesslich zur Bildung der Zwischenprodukte kam. Für die präparative Darstellung mussten deshalb nicht nur die zur Bildung günstigsten Oxydationsverhältnisse gewählt, sondern auch ein Weg zur Abtrennung der entstehenden Produkte aus der Oxydationslösung gefunden werden.

a) Wahl der günstigsten Oxydationsbedingungen

Ein Vergleich der bei der Papierchromatographie erhaltenen Ergebnisse zeigte, dass die Oxydation mit einem Überschuss von Wasserstoffperoxyd, verbunden mit einem Abstoppen der Reaktion nach einer bestimmten Dauer, zu keinem Zeitpunkt grössere Mengen der Zwischenprodukte entstehen liess. Diese Methode kam deshalb für die Versuche nicht in Betracht.
Bessere Ergebnisse versprach die Oxydation mit einer geringeren Menge von Wasserstoffperoxyd, wobei die Reaktion ohne Inhibierung lediglich durch Mangel an Oxydationsmittel abgebrochen wurde. Die Oxydation des Kämpferol-3-glukosids durch 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2 hatte hier zu einer maximalen Bildung von Zwischenprodukten geführt.

Um den Einfluss von Puffersubstanzen bei der Oxydation auszuschliessen und vor allem die nachfolgende Abtrennung der Zwischenprodukte zu erleichtern, sollte in ungepufferten wässerigen Lösungen gearbeitet werden. Deshalb wurden Vorversuche in solchen Lösungen, die einen pH-Wert von 5 bis 6 besassen, durchgeführt und papierchromatographische Vergleiche mit pH 7-gepuf-

ferten Lösungen angestellt. Grössere Unterschiede in der Menge der Zwischenprodukte waren nicht erkennbar.

Die Oxydation des Kämpferol-3-glukosids wurde aus diesem Grund in ungepufferter wässeriger Lösung und unter Zusatz von 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd durchgeführt. Sofort nach Fermentzugabe trübten sich die Ansätze stark unter Graugrünfärbung, die nach wenigen Minuten in eine bestehenbleibende Gelbfärbung überging.
Nach zweistündigem Stehen der Ansätze wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Zurück blieb ein bräunlich-gelber Rückstand, der das Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Zwischenprodukte bildete.

b) Präparative Auftrennung des Gemisches der Oxydationsprodukte

Das Problem bestand nunmehr in der Isolierung der Zwischenprodukte aus dem erhaltenen Gemisch, das ausser ihnen grössere Mengen von nicht oxydiertem Kämpferol-3-glukosid und daneben einen beträchtlichen Anteil höher oxydierter Produkte aufwies. Darüber hatten die papierchromatographischen Untersuchungen Aufschluss gegeben.

Wie schon bei der Darstellung der Kämpferolglykoside aus dem Kastanienblütenextrakt, wurde auch hier eine Trennung der einzelnen Komponenten mit Hilfe der Adsorptionschromatographie an Polyamidpulver versucht.
Methanolische Lösungen des Oxydationsrückstandes wurden auf methanolgesättigten Säulen der Chromatographie unterworfen und die Trenneffekte beobachtet. Wie nach den papierchromatographischen Versuchen zu erwarten war, trat eine Auftrennung in mehrere Zonen ein. Jedoch war die Adsorption derjenigen Zonen, die offenbar Zwischenprodukte darstellten, an das Polyamidpulver so gross, dass selbst bei längeren Laufzeiten nur ungenügende Trennung stattfand und an eine Elution auch bei Verwendung kürzerer Säulen nicht zu denken war.

Daraufhin wurden Versuche mit anderen Lösungsmitteln begonnen,

die eine stärkere Affinität zum Polyamid besitzen. HÖRHAMMER und WAGNER (24) geben folgende Lösungsmittelreihe, nach zunehmender Affinität geordnet, an:
Äthanol - Methanol - Azeton - Natronlauge - Formamid - Dimethylformamid.
Azeton als Lösungsmittel führte zu keinen besseren Ergebnissen als Methanol.
Natronlauge kam nicht in Frage, da hierbei mit autoxydativen Veränderungen der phenolischen Zwischenprodukte gerechnet werden musste.
Mit Formamid und Dimethylformamid wurden Versuche durchgeführt. Beide waren als Elutionsmittel brauchbar, es trat Auftrennung in mehrere Zonen ein. Jedoch war die Durchlaufgeschwindigkeit selbst durch kurze Säulen sehr gering. Da es ausserdem schwierig war, diese Lösungsmittel ohne Zersetzung der Zwischenprodukte zu entfernen, kamen auch sie nicht in Betracht.
Bei der weiteren Suche nach geeigneten Elutionsmitteln erwies sich dann Tetrahydrofuran, allein und in Mischung mit Methanol, als sehr gut verwendbar. Dieses Lösungsmittel war bisher noch nicht für die Chromatographie an Polyamid beschrieben worden. Nach "ULLMANNs Encyklopädie der technischen Chemie" (53) verhält sich Tetrahydrofuran auch indifferent gegenüber Polyamid, so dass eine stärkere Verunreinigung der Lösungen durch Polyamidbestandteile nicht zu befürchten war.

Als am besten geeignet für die Chromatographie der Oxydationsprodukte erwies sich nach mehreren Versuchen eine Methanol-Tetrahydrofuranmischung im Verhältnis 1:1. Schon auf Säulen geringer Füllhöhe trennte sich das Gemisch der Oxydationsprodukte nach kurzer Zeit in mehrere Zonen (Abb. 19).
Als erste und weitaus am schnellsten laufende Zone wurde das nicht oxydierte Kämpferol-3-glukosid eluiert.
Es folgten drei sehr schwache Zonen (A, B und C), die im Tageslicht gelb gefärbt waren und sich im UV-Licht dunkel abhoben.
Als letzte wurde eine sehr starke, im Tageslicht gelbe Zone (D) eluiert, die sich ebenfalls im UV-Licht dunkel abhob.
Zwei schwache dunkelgelbe Zonen (E und F), die darauf folgten, wiesen nur sehr geringe Beweglichkeit auf und wurden nicht mehr

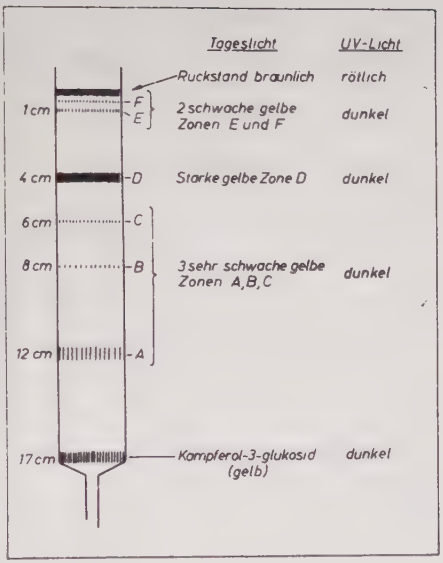

Abb. 19
Trennung der Oxydationsprodukte auf methanol-tetrahydrofuran(1+1)-gesättigter Polyamidsäule nach 2,5 Stunden Laufzeit.

eluiert. Ihre Laufstrecken betrugen nach 20-stündiger Elution, als die starke gelbe Zone (D) eluiert war, lediglich 4 und 6 cm. Es war zu vermuten, dass es sich bei ihnen um weiter oxydierte Produkte höheren Polymerisationsgrades handelte.
In mehreren Ansätzen wurde nunmehr eine grössere Menge von Oxydationsgemisch getrennt. Aufgefangen wurden

1. nicht oxydiertes Kämpferol-3-glukosid
2. die darauf folgenden Zonen A, B und C, wegen der geringen Mengen als Gemisch
3. die starke gelbe Zone D.

Anschliessend wurden die Fraktionen im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.
Das Gemisch der Zonen A, B und C bildete eine so geringe Menge, dass eine erneute Auftrennung und anschliessende Untersuchung aussichtslos erschienen. Bei der papierchromatographischen Un-

tersuchung zeigten diese Zonen Rf-Werte zwischen 0,1 und 0,3 (System Butanol-Eisessig-Wasser 4+1+1); sie waren also mit den im papierchromatographischen Teil beschriebenen "Schwänzen" vom Rf 0,1 bis 0,3 identisch.
Die starke gelbe Zone D, von der eine grössere Menge angefallen war, wurde näher untersucht.

c) Charakterisierung eines Oxydationsproduktes

Der nach Entfernung des Tetrahydrofuran-Methanolgemisches erhaltene gelbe Rückstand der Zone D wurde zur Reinigung mehrmals aus absolutem Äthanol umkristallisiert. Auffallend war hierbei die geringe Löslichkeit; in heissem Äthanol löste sich die Substanz nach längerem Kochen nur zu etwa 0,1 %. Beim Erkalten trat trotz mehrfacher Versuche keine Kristallisation ein; die Substanz fiel in amorphen durchscheinenden Flocken aus, die nach dem Absaugen eine voluminöse gelartige Masse bildeten. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator blieben glasartige gelbe Stücke zurück.

Der Schmelzpunkt lag bei 233 - 235° C unter Braunfärbung. Beim Erhitzen über 200° C färbte sich die Substanz bereits dunkelgelb, über 215° C hellbraun.

Papierchromatographisch unterschied sich die Substanz deutlich vom Kämpferol-3-glukosid. Der Rf-Wert in Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+1) betrug 0,45 (Kämpferol-3-glukosid, Rf = 0,67); es handelte sich also um das Oxydationsprodukt, das schon bei den papierchromatographischen Versuchen durch seine Menge aufgefallen war. Die häufig etwas langgezogenen Flecken waren im Tageslicht gelb gefärbt; im UV-Licht hoben sie sich wie Kämpferol-3-glukosid dunkel ab.
Nach Behandlung mit Aluminiumchlorid trat im UV-Licht nur verstärkte Gelbfärbung ein, im Gegensatz zur gelbgrünen Fluoreszenz des Kämpferol-3-glukosids. Das Ausbleiben jeglicher Fluoreszenzerscheinungen war auch bei allen anderen Oxydationsprodukten beobachtet worden.

Gute Ergebnisse wurden bei dünnschichtchromatographischen Versuchen unter Verwendung von Polyamidpulver als Adsorbens erhalten. Mit Tetrahydrofuran-Methanol (1+1) als Laufmittel trennten sich Kämpferol-3-glukosid und das Oxydationsprodukt in ähnlicher Weise wie bei der Säulenchromatographie (Abb. 20).

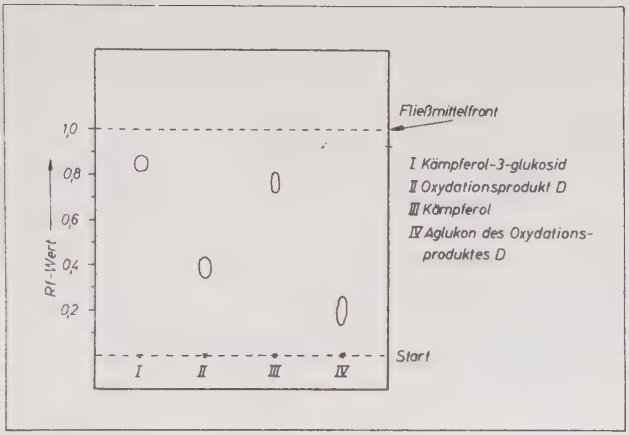

Abb. 20 Dünnschichtchromatographische Trennung an Polyamidpulver mit Tetrahydrofuran-Methanol (1+1) als Laufmittel.

Die Elementaranalyse des Oxydationsproduktes ergab einen durchschnittlichen C-Gehalt von 57,08 % und einen H-Gehalt von 5,14 %. Diese Werte stimmen etwa überein mit den für Kämpferol-3-glukosid berechneten theoretischen Mengen von 56,25 % C und 4,5 % H.

Weitgehende Übereinstimmung mit Kämpferol-3-glukosid zeigte sich auch im UV-Absorptionsspektrum (Abb. 21). Die gesamte Absorptionskurve liegt beim Oxydationsprodukt allerdings niedriger, so dass auch die speziellen Extinktionskoeffizienten in den Maxima geringere Werte besitzen (Tab. 5).

Die Hydrolyse des Oxydationsproduktes mit Schwefelsäure ergab Glukose, die papierchromatographisch nachgewiesen wurde, und ein feinkristallines gelbes Aglukon.

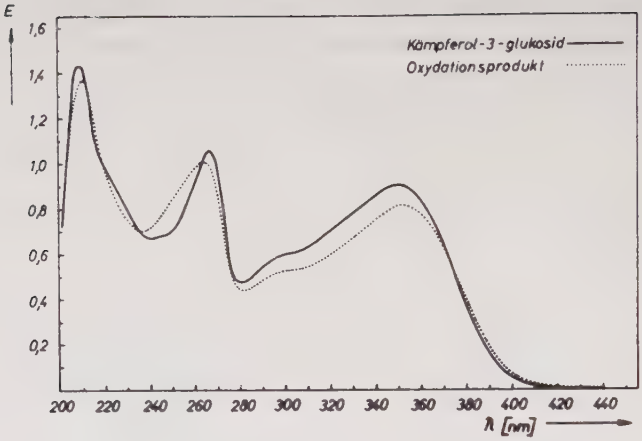

Abb. 21 Spektren von Kämpferol-3-glukosid und dem Oxydationsprodukt
Konzentration: jeweils 2,242 mg wasserfreie Substanz/ 100 ml Methanol

	1. Maximum		2. Maximum	
	λ (nm)	$E^{1\ \text{‰}}_{1\ \text{cm}}$	λ (nm)	$E^{1\ \text{‰}}_{1\ \text{cm}}$
Kämpferol-3-glukosid	350	38,9	266	46,9
Oxydationsprodukt D	352	36,3	265	44,8
Kämpferol	366	73,7	267	60,1
Aglukon des Oxyd.-produktes D	367	56,1	253	55,8

Tab. 5 Lage der Maxima und spezielle Extinktionskoeffizienten. Die $E^{1\ \text{‰}}_{1\ \text{cm}}$-Werte wurden von den wasserfreien Substanzen erhalten oder sind darauf umgerechnet.

Ein Schmelzpunkt dieses Aglukons konnte nicht gefunden werden; beim Erhitzen über 335° C trat unter zunehmender Braun- und Schwarzfärbung Zersetzung ein. Im Gegensatz zum Kämpferol zeigte

es auch keinerlei Sublimationserscheinungen.

Papierchromatographisch unterschied sich das Aglukon nur wenig vom Kämpferol. Sein Rf-Wert in PARTRIDGE-Gemisch (4+1+1) betrug 0,92; mitgelaufenes Kämpferol hatte einen Rf-Wert von 0,85. Auch mit anderen Laufmitteln konnten keine besseren Trennungen erzielt werden.

Dagegen zeigten beide Agluka sehr unterschiedliches Verhalten bei der Polyamid-Dünnschichtchromatographie. Mit Tetrahydrofuran-Methanol (1+1) als Laufmittel hatte Kämpferol einen Rf-Wert von 0,76, das Aglukon des Oxydationsproduktes dagegen von 0,20 (Abb. 20).

Die Flecken des Aglukons waren sowohl im Tageslicht als auch im UV-Licht gelb gefärbt. Nach Besprühen mit Aluminiumchloridlösung traten sie im UV-Licht wesentlich intensiver hervor; Fluoreszenz wie beim Kämpferol war nicht zu beobachten.

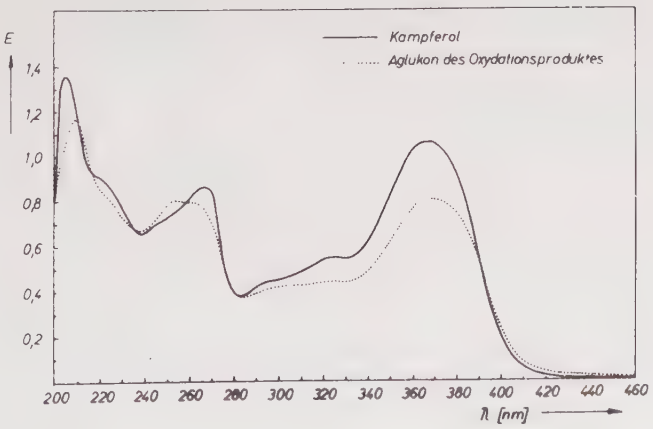

Abb. 22 Spektren von Kämpferol und dem Aglukon des Oxydationsproduktes
Konzentration: jeweils 1,431 mg wasserfreie Substanz/ 100 ml Methanol

Das UV-Absorptionsspektrum des Aglukons (Abb. 22) entsprach im wesentlichen dem des Kämpferols; allerdings ist das 2. Maximum zum Kurzwelligen hin verschoben und zeigt deutlich eine Verbreiterung und Ausbildung zweier nebeneinanderliegender Teilmaxima. Die speziellen Extinktionskoeffizienten in den Maxima sind beim Aglukon des Oxydationsproduktes ebenfalls geringer als beim Kämpferol (Tab. 5).

Das Ausbleiben von Fluoreszenzerscheinungen beim Oxydationsprodukt und seinem Aglukon nach Behandlung mit Aluminiumchlorid konnte nicht nur auf Papierchromatogrammen, sondern auch bei Lösungen beobachtet werden. Sie färbten sich mit Aluminiumchlorid lediglich stark gelb, während Vergleichslösungen von Kämpferol-3-glukosid und Kämpferol die übliche gelbgrüne Fluoreszenz zeigten.
Deshalb erschien eine Untersuchung der Spektren der Aluminiumkomplexe interessant. Es wurden die Komplexe der vier Verbindungen hergestellt und ihre Spektren miteinander verglichen;

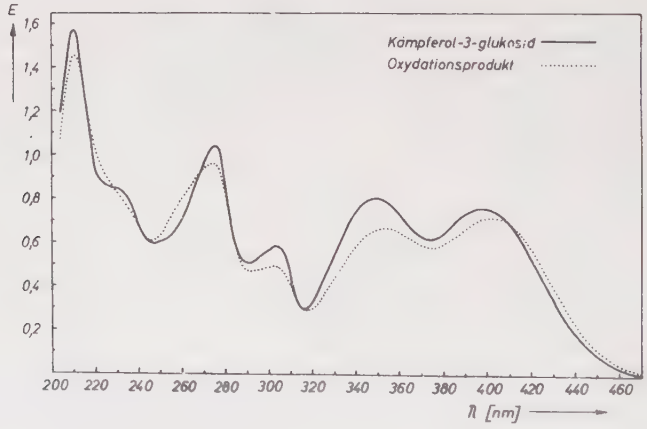

Abb. 23 Spektren der Aluminiumkomplexe von Kämpferol-3-glukosid und dem Oxydationsprodukt
Konzentration: jeweils 2,242 mg wasserfreie Substanz/ 100 ml Methanol

Abb. 23 zeigt die von Kämpferol-3-glukosid und dem Oxydationsprodukt.
Dabei ergab sich Übereinstimmung sowohl zwischen Kämpferol-3-glukosid und dem Oxydationsprodukt als auch zwischen Kämpferol und dem Aglukon des Oxydationsproduktes. Das Fehlen der Fluoreszenz bei den Oxydationsprodukten ist also nicht mit einer Veränderung der Spektren verbunden, die Fähigkeit zur Komplexbildung ist voll erhalten.

Auf Grund des mit Kämpferol-3-glukosid übereinstimmenden Spektrums und des papier- und säulenchromatographischen Verhaltens wurde für das isolierte Oxydationsprodukt sowie für sein Aglukon eine dimere Struktur in Erwägung gezogen. Zum Beweis führten wir Molgewichtsbestimmungen nach verschiedenen Methoden durch.
Einmal wurde die Methode nach RAST, modifiziert als Mikrobestimmung (47), angewendet, mit der auch FREUDENBERG (12) das Molekulargewicht des dimeren Catechins ermittelt hatte. Ausserdem wurden Bestimmungen mit dem Dampfdruck-Osmometer durchgeführt, einer neuen, nach dem Prinzip der isothermen Destillation arbeitenden Apparatur. Dabei werden mit Hilfe von Thermistoren die zwischen einer Lösung und einem Lösungsmittel in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Atmosphäre auftretenden Temperaturdifferenzen gemessen. Diese Differenzen kommen zustande durch den Geschwindigkeitsunterschied der Verdampfung und Kondensation des Lösungsmittels.

Da das Oxydationsprodukt und sein Aglukon sowohl in Kampfer als auch in den für die osmometrische Bestimmung günstigen Lösungsmitteln nur unzureichend löslich waren, wurden die Molekulargewichtsbestimmungen an einem azetylierten Aglukon durchgeführt.
Eine Azetylgruppenbestimmung dieser Substanz, ausgeführt durch Bestimmung der C-Methylgruppen, ergab CH_3-Werte von 11,27 und 11,76 %. Diese Werte kommen einem angenommenen dimeren Kämpferol nahe, bei dem 6 Hydroxylgruppen (10,97 % CH_3) oder aber 7 (12,17 % CH_3) azetyliert sind.
Das theoretische Molekulargewicht eines solchen Dimeren wäre

bei 6 azetylierten OH-Gruppen 822,62, bei 7 aber 864,66.

Die Molgewichtsbestimmungen nach RAST ergaben folgende Werte:

1.) 853 2.) 761 3.) 785

Mittelwert: 800

Die verhältnismässig grossen Differenzen zwischen den einzelnen Werten sind z.T. darauf zurückzuführen, dass bei längerem Erhitzen der Proben die Schmelzpunktsdepressionen laufend zunahmen. Am niedrigsten waren die Depressionen, wenn die Substanz-Kampfermischungen im vorgewärmten Heizbad nur kurz zusammengeschmolzen wurden und auch die Schmelzpunktsbestimmungen in vorgewärmter Schwefelsäure möglichst schnell erfolgten. Die Zunahme der Depression bei längerem Erhitzen, die auch FREUDENBERG beim azetylierten dimeren Catechin beobachtete, ist wohl auf Zersetzungserscheinungen bei der hohen Temperatur des geschmolzenen Kampfers zurückzuführen. Einen Beweis dafür bildete die zunehmende Gelb- bis Bräunlichfärbung der anfangs hellgelben Kampferschmelze.
Versuche, das niedrig schmelzende Camphen (Fp 51 - 52° C) als Lösungsmittel für die RAST-Methode zu verwenden, misslangen, da das azetylierte Produkt darin nur wenig löslich war.

Die Molgewichtsbestimmungen mit Hilfe des Osmometers brachten folgende Ergebnisse:

1.) 857 verwendetes Lösungsmittel: Pyridin
2.) 807 verwendetes Lösungsmittel: Methyläthylketon

Mittelwert: 832

Auf Grund dieser Molekulargewichtsbestimmungen konnte die dimere Struktur des Oxydationsproduktes als sicher angenommen werden. Offen war lediglich die Frage, in welcher Weise die beiden Monomeren miteinander verknüpft waren.
Da nur sehr geringe Mengen des Oxydationsproduktes zur Verfügung standen, kamen Spaltungsreaktionen mit anschliessender präparativer Darstellung der Spaltprodukte, wie sie u.a. von BAKER und Mitarbeitern (1) an Biflavonen durchgeführt wurden,

nicht in Betracht. Wir mussten uns deshalb auf die Durchführung der Alkalischmelze, der wichtigsten Methode zur Strukturaufklärung von Flavonoiden (54), beschränken. Die Spaltprodukte der Alkalischmelze wurden aus dem angesäuerten Gemisch mit Äther ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit Testsubstanzen identifiziert.
Gefunden wurden die gleichen Spaltprodukte, die auch Kämpferol selbst ergibt:

1. p-Oxybenzoesäure, Rf 0,67 (Zellulose-Dünnschicht, Laufmittel Benzol-Propionsäure-Wasser 2+2+1)
2. Phlorogluzin, Rf 0,72 (Zellulose-Dünnschicht, Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser 4+1+5)

Daneben fielen bei der Chromatographie in beiden Systemen zwei gelbe Flecken auf, von denen einer mit dem - nicht abgebauten - Aglukon des Oxydationsproduktes identisch war.
Der andere Fleck fluoreszierte nach Besprühen mit Aluminiumchlorid intensiv grüngelb im UV-Licht, zeigte also das für Flavonolaglukone typische Verhalten. Er war jedoch weder mit Kämpferol noch mit Quercetin oder Morin identisch, wie weitere dünnschichtchromatographische Versuche ergaben. Verwendet wurde das von EGGER (8) für Flavonolaglukone beschriebene Gemisch Chloroform-Eisessig-Wasser (13+6+1). Die Rf-Werte betrugen (Zellulose-Dünnschicht):

Spaltprodukt	Rf 0,3
Kämpferol	Rf 0,45

Eine weitergehende Identifizierung war wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge nicht möglich.

C. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die spektralphotometrischen und papierchromatographischen Untersuchungen der Oxydation des Kämpferol-3-glukosids haben einen kleinen Einblick in die dabei ablaufenden Vorgänge gegeben. Unter bestimmten Bedingungen liess sich ein Reaktionsprodukt isolieren, das als Dimeres identifiziert wurde. Im folgenden sollen die Versuchsergebnisse in Hinblick auf die Reaktionsmechanismen der fermentativen Oxydation und der Polymerisation erörtert werden.

Bei der Reaktion von Phenolen mit dem System Peroxydase-H_2O_2 muss zwischen zwei voneinander getrennten Reaktionsabschnitten unterschieden werden. Den ersten Abschnitt bildet die fermentative Oxydation, die in der Dehydrierung von phenolischen Gruppen durch den Peroxydase-H_2O_2-Komplex besteht, den zweiten bilden die nichtfermentativen Folgereaktionen der dehydrierten Produkte.
Als Ergebnis der fermentativen Dehydrierung entstehen freie Radikale, die man heute allgemein als Primärprodukte der Phenol-Dehydrierungen annimmt (2, 9). Für diese Radikale lassen sich mehrere mesomere Grenzstrukturen formulieren, durch die ihre Reaktionsweise erklärt werden kann (Abb. 24):

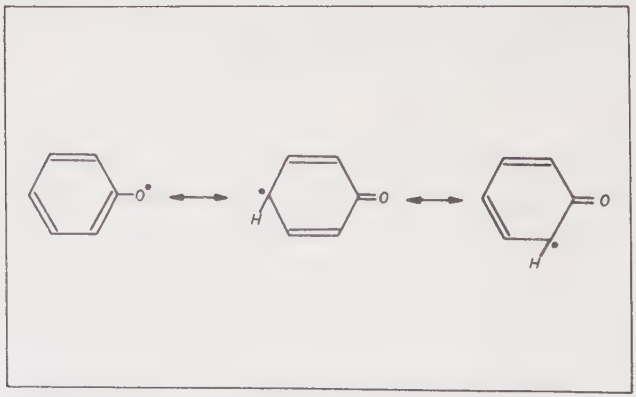

Abb. 24

Die gebildeten freien Radikale sind ausserordentlich unbeständig und reagieren schnell weiter. Gewöhnlich dimerisieren sie miteinander, wobei die Phenolstruktur zurückgebildet wird und Stabilisierung eintritt. Wie die mesomeren Grenzstrukturen erkennen lassen, sind mehrere Kupplungsmöglichkeiten vorhanden. Es können Dimere mit C-C-, C-O- oder O-O-Bindungen entstehen. Für die letzte Möglichkeit sind bisher kaum Beispiele gefunden worden, so dass die Bildung von Peroxydbrücken vermutlich wenig Wahrscheinlichkeit besitzt. Am Beispiel des Phenols ergeben sich demnach folgende Möglichkeiten der Dimerisation (Abb. 25):

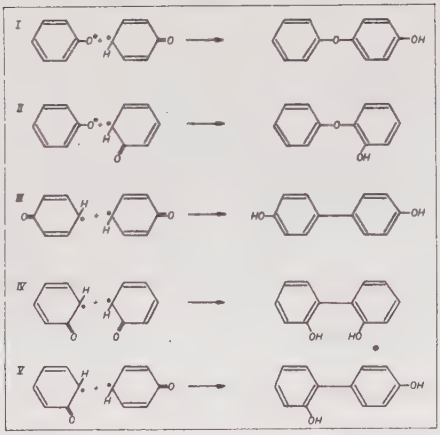

Abb. 25

Auch beim Kämpferol-3-glukosid wird also als Primärreaktion eine fermentativ katalysierte Abspaltung von Wasserstoff von den phenolischen Hydroxylen stattfinden. Für den Fall, dass nur eine Hydroxylgruppe pro Mol Kämpferol-3-glukosid dehydriert wird, ergeben sich drei verschiedene Radikale (Abb. 26, I-III), für die jeweils mehrere mesomere Grenzstrukturen (Abb. 26, IV-VIII) formuliert werden können. Diese Grenzstrukturen zeigen, dass theoretisch die Bildung von 22 verschiedenen Dimeren möglich ist; dabei sind die Strukturen V und VI der Abb. 26 gleichgesetzt, da sie zu den gleichen Reaktionsprodukten führen. Auch die Reaktion von zwei Radikalen zu Peroxyden wurde ausser Be-

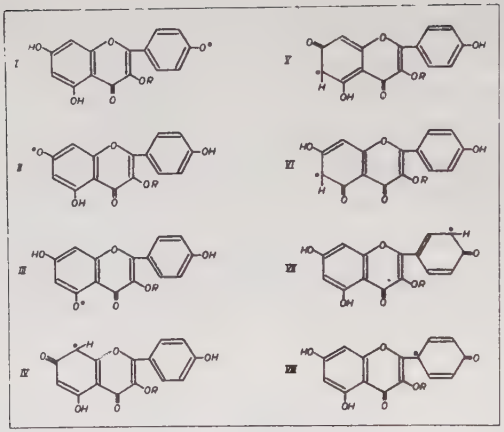

Abb. 26

tracht gelassen. Diese Dimeren können bei einem Überschuss von Wasserstoffperoxyd ihrerseits wieder fermentativ dehydriert werden und mit anderen monomeren oder dimeren Radikalen zu höhermolekularen Verbindungen weiterreagieren. Das Ende der Reaktion wird dann durch sterische Faktoren und die Löslichkeit der entstehenden Polymeren bestimmt.
Die Polymerisationsmöglichkeiten des Kämpferol-3-glukosids sind also infolge der drei Hydroxylgruppen sehr vielfältig, wobei allerdings vorausgesetzt wird, dass alle drei Hydroxyle durch die Peroxydase dehydriert werden und zur Bildung von Radikalstrukturen beitragen.

Inwieweit entsprechen nun die erhaltenen Versuchsergebnisse diesen theoretischen Vorstellungen?
Die papierchromatographische Untersuchung von Reaktionslösungen zeigte, dass Polymerisation des Kämpferol-3-glukosids zu höhermolekularen Produkten eintritt. Je nach Grösse des Polymerisationsgrades besassen diese Substanzen mittlere oder kleine Rf-Werte oder aber bewegten sich nicht mehr vom Startpunkt fort. Der Grad der Polymerisation war abhängig von der Menge des Oxydationsmittels und der Einwirkungszeit des Fermentes. Im einzelnen liess sich feststellen, dass die Produkte von mittlerem Rf-Wert, die also einen geringen Polymerisationsgrad besassen,

nie in grösserer Menge auftraten. Sie hatten allerdings ein Maximum bei der Oxydation mit 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2. Daneben entstand schon bei dieser geringen Wasserstoffperoxydmenge ein beträchtlicher Anteil von höhermolekularen Produkten. Offenbar unterliegen die zuerst gebildeten niederen Polymeren in demselben oder noch stärkeren Masse als das Monomere der fermentativen Dehydrierung und anschliessenden Polymerisation. Eine grössere Menge von Dimeren und anderen niederen Polymerprodukten wird deshalb nur bei Reaktionsbeginn und nach der Oxydation mit wenig Wasserstoffperoxyd gefunden. Mit einem Überschuss von Oxydationsmittel läuft die Reaktion bis zur Bildung von Hochpolymeren weiter.

Es tritt nun die Frage auf, ob alle drei Radikale, deren Bildung bei der Einwirkung der Peroxydase auf das Kämpferol-3-glukosid möglich ist (Abb. 26, I-III), auch tatsächlich gebildet werden und an der Polymerisation teilnehmen. Die Dehydrierung der 4'-Hydroxylgruppe des Kämpferol-3-glukosids scheint sicher, wenn man die Oxydation des p-Kresols oder des Tyrosins zum Vergleich heranzieht. Unsicher ist dagegen die Beteiligung der Hydroxylgruppen in 5- und 7-Stellung, da Versuche mit solchen Verbindungen, die nur an diesen Stellen hydroxyliert sind, bisher nicht beschrieben wurden. Eine gewisse Antwort auf das Problem geben aber die spektralphotometrischen Versuche.

Das Spektrum des Kämpferol-3-glukosids entspricht mit seinen beiden Maxima bei 265 und 345 nm dem aller anderen Flavone und Flavonole, deren Absorptionsbanden zwischen 320 und 380 nm (1. Maximum), bzw. zwischen 240 und 270 nm (2. Maximum) liegen. Lage und Intensität der Maxima werden weitgehend bestimmt durch die verschiedenen mesomeren Grenzstrukturen, die von der Stellung der Hydroxylgruppen abhängen (27). Für das Kämpferol ergeben sich die in Abb. 27 dargestellten Möglichkeiten der Mesomerie.
Obwohl sich diese Strukturen zweifellos gegenseitig beeinflussen, glaubt JURD (28) auf Grund seiner Versuche, dass man das 1. (langwellige) Maximum hauptsächlich der Absorption der sogenannten Cinnamoylgruppierung (I) zuordnen kann, während das

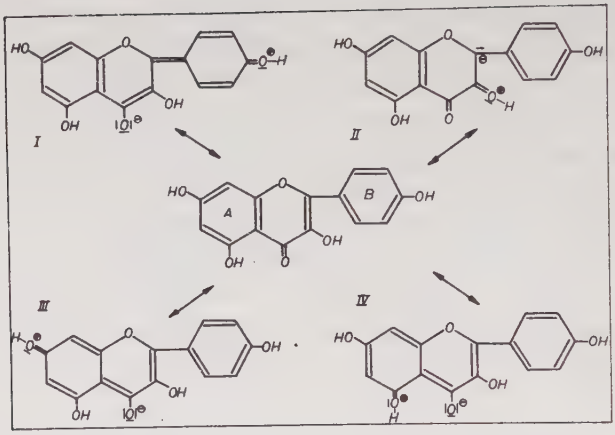

Abb. 27

2. (kurzwellige) Maximum im wesentlichen auf die Absorption der sogenannten Benzoylgruppierung (III) zurückgeht. Elektronenabgebende Substituenten, beispielsweise Hydroxylgruppen, am Ring A beeinflussen vor allem das kurzwellige Maximum; Hydroxylgruppen am Ring B wirken sich dagegen überwiegend auf das langwellige Maximum aus.
Betrachtet man die Spektren des Kämpferol-3-glukosids nach der Oxydation mit Peroxydase-H_2O_2 (Abb. 8 und 9), dann fällt auf, dass sowohl das kurzwellige als auch das langwellige Maximum unter starkem Extinktionsabfall völlig verschwinden. Die an der Mesomerie beteiligten freien Hydroxylgruppen müssen also, mindestens teilweise, verloren gegangen sein. Da die Extinktionsabnahmen im langwelligen und im kurzwelligen Maximum etwa gleich sind, kann angenommen werden, dass Hydroxylgruppen an beiden Ringen, A und B, reagiert haben. Bei den entstandenen Polymeren werden deshalb nicht nur die Phenylseitenringe miteinander verknüpft sein (B-B), sondern auch die Chromongerüste (A-A), bzw. die Phenylseitenringe mit Chromongerüsten (B-A).

Strukturen des letzten Typs, bei denen zwei Flavone durch Verknüpfung eines A- und eines B-Ringes miteinander verbunden sind, wurden bereits für einige natürlich vorkommende Biflavone mit

Sicherheit nachgewiesen (1, 13). Es ist durchaus möglich, dass diese Verbindungen in ähnlicher Weise durch Dimerisation von Flavonradikalen in der Pflanze entstehen (1).

Damit erhebt sich die Frage nach der Verknüpfung der Monomeren bei dem isolierten dimeren Kämpferol-3-glukosid. Dieses Dimere übertraf hinsichtlich seiner Menge alle anderen niederen Polymerprodukte. Dafür sind zwei verschiedene Erklärungen möglich:

1. Das Dimere wird auf Grund seiner Struktur in etwas geringerem Masse von Peroxydase-H_2O_2 oxydiert und kann sich anreichern, während die übrigen Dimeren der weiteren Oxydation unterliegen.
2. Da die Oxydierbarkeit der verschiedenen Hydroxylgruppen unterschiedlich ist, wird die am leichtesten oxydierbare OH-Gruppe am häufigsten dehydriert und das dabei gebildete Radikal in grösserer Konzentration als die anderen vorliegen. Unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Radikale werden aber auch zu verschiedenen Mengen der dimeren Produkte führen.

Welcher der beiden Möglichkeiten der Vorzug zu geben ist, lässt sich aus den Versuchsergebnissen nicht entnehmen.

Infolge der geringen Substanzmenge war eine exakte Strukturanalyse des dimeren Kämpferol-3-glukosids nicht möglich. Es konnten nur einige Anhaltspunkte ermittelt werden, die folgende Schlüsse zulassen:

1. Die Azetylgruppenbestimmung des azetylierten Aglukons ergab einen Gehalt von höchstens 7 Azetylgruppen, das entspricht höchstens 5 freien Phenolhydroxylen beim dimeren Glykosid. Eine Hydroxylgruppe ist also verloren gegangen; diese Tatsache macht eine Ätherbindung zwischen den beiden Monomeren wahrscheinlich.
2. Die Komplexbildungsfähigkeit des dimeren Kämpferol-3-glukosids mit Aluminiumchlorid war nicht beeinträchtigt. Diese Komplexbildungsfähigkeit beruht beim Kämpferol-3-glukosid auf der Ketogruppe in 4-Stellung und der freien Hydroxylgruppe in 5-Stellung. An der Verknüpfung der beiden Monomeren kann also die Hydroxylgruppe in 5-Stel-

lung nicht beteiligt sein.

3. Als Ergebnis der Alkalispaltung des Dimeren entstanden wie beim Kämpferol Phlorogluzin und p-Oxybenzoesäure. Andere aromatische Carbonsäuren liessen sich nicht nachweisen. Das deutet darauf hin, dass beim Dimeren weder eine C-C-Verknüpfung zweier Phlorogluzinkerne noch eine solche zweier p-Oxybenzoesäurekerne besteht. In jedem dieser Fälle wäre eins der beiden Abbauprodukte nicht nachweisbar gewesen.

Bei Berücksichtigung dieser wenigen Angaben bleiben selbstverständlich immer noch mehrere Strukturmöglichkeiten des Dimeren offen. Die Entscheidung darüber könnten nur Untersuchungen in weitaus grösserem Masstabe erbringen.
Ob die bei den Versuchen erhaltenen Polymerisate einen Vergleich mit irgendwelchen natürlichen Produkten zulassen, ist fraglich. In der Pflanzenzelle liegen ja Gemische der verschiedensten phenolischen Substanzen vor, die bei der unspezifischen Wirkung der Peroxydase alle zur Reaktion kämen; Polymerisate des hier entstandenen Typs würden also Zufallsprodukte sein. Die Untersuchungen zeigen aber, dass Kämpferolglykoside bei der Einwirkung von Peroxydase-H_2O_2 in ähnlicher Weise polymerisieren, wie es für andere Phenole bereits bekannt ist; sie können also durchaus zur Gerbstoffentstehung in der Pflanze beitragen.

D. Experimenteller Teil

1. Isolierung der Kämpferolglykoside

a) Extraktbereitung

18 kg getrocknete Blütenstände von Aesculus Hippocastanum L.[+] wurden durch Auslesen von den Stielen befreit und in Anteilen von etwa 1 kg mit 4 l Methanol übergossen. Nach achttägiger Mazeration wurde noch etwa 1 Stunde auf einem siedenden Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt, darauf der Extrakt abgegossen und die Blütenrückstände abgepresst. Die erhaltene braungrüne Lösung wurde im Vakuum unter Verwendung eines Eindampfgerätes nach HECKER und KARLSON (20) vom Methanol befreit. Zurück blieb ein dicker Extrakt, der mit etwa 500 ml Wasser versetzt und 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad mazeriert wurde. Noch heiss wurde dieses Mazerat filtriert und dabei die Hauptmenge des Chlorophylls und andere wasserunlösliche Begleitstoffe abgetrennt. Es wurde eine klare braune Lösung erhalten, die stark flavonoidhaltig war, wie Reduktionsproben mit Magnesium und Salzsäure zeigten.

b) Reduktionsprobe (54)

Wenige ml wässerigen Extraktes wurden mit einer Messerspitze Magnesiumpulver versetzt und langsam 10 %ige Salzsäure dazugetropft. Die auftretende rote Färbung, zurückzuführen auf Anthocyanbildung, wurde als Mass für den Flavonoidgehalt gewertet.

c) Isolierung durch Säulenchromatographie

Die wässerige, vom Chlorophyll befreite Flavonoidlösung wurde zur weiteren Reinigung auf Polyamidsäulen chromatographiert. Als Adsorbens fand ein gröberes Polyamidpulver Verwendung, das von der Badischen Anilin- und Sodafabrik unter der Bezeichnung

---

[+] Bezogen von der Fa. Hego, Vegetabilienvertrieb, Buch/Hunsrück

Ultramid K 228 BM 2 geliefert wurde[+].
Je 400 ml der Lösung, etwa 800 g trockener Droge entsprechend, wurden auf Säulen (Durchmesser 5 cm, Länge 35 cm) mit ca. 500 ml wassergesättigtem Polyamidpulver gegeben und mit 2 l Wasser nachgewaschen. In dem ablaufenden Eluat konnten mit Hilfe der Reduktionsprobe keine Flavonoide gefunden werden; es enthielt aber eine grosse Menge von Zuckern, wie der süsse Geschmack und der Nachweis mit FEHLING'scher Lösung zeigten.
Anschliessend wurden die Säulen mit etwa 2 l Methanol eluiert. Dabei lösten sich die Flavonoide ab, während Gerbstoffe und andere höhermolekulare Phenole, kenntlich an ihrer braunen Farbe, auf der Säule verblieben und nur wenig weiterwanderten.
Die methanolischen Flavonoidlösungen wurden im Eindampfgerät nach HECKER und KARLSON bei 30° C zur Trockne eingedampft. Es ergaben sich insgesamt 250 g eines gelbbraunen spröden Rückstandes, der sehr hygroskopisch war und, wie die papierchromatographische Untersuchung zeigte, aus einem Gemisch mehrerer Flavonglykoside bestand.
Zur Trennung dieses Gemisches wurden Chromatographiesäulen von 1,6 l Inhalt (Durchmesser 7,2 cm, Länge der Polyamidschicht 40 cm) verwendet. Als Adsorbens diente das sehr feine Polyamidpulver der BASF, das die Versuchsbezeichnung pp 15 Sp trug und bei der Trennung der Glykoside bessere Ergebnisse lieferte als das gröbere Ultramid K 228 BM 2. Das Pulver wurde 24 Stunden in Wasser quellen gelassen, dann ohne Anwendung von Druck in die Säulen eingeschlämmt und mit reinem Methanol nachgewaschen. Die jetzt methanolgesättigte Polyamidschicht wurde mit einer Scheibe Filtrierpapier bedeckt und die methanolische Lösung des Flavonoidtrockenextraktes mit Hilfe einer Pipette vorsichtig aufgetragen. Nach Einsickern der Flavonoidlösung wurden die Säulen mit Methanol entwickelt.

Auf jeder Säule wurden 2,5 g des Flavonoidtrockenextraktes getrennt, die zum Auftragen in 30 ml Methanol gelöst wurden. Schon

---

[+] Der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen, danken wir an dieser Stelle für die grosszügige Überlassung des Polyamidpulvers.

urze Zeit nach Beginn der Chromatographie trennte sich das emisch in mehrere gelbe Zonen auf. Nach 7 Stunden - in dieser eit hatte die erste Zone ca. 1/3 der Polyamidschicht passiert - urden die Säulen auf einen Fraktionssammler gesetzt und das luat in Fraktionen von ca. 40 ml aufgefangen. Nach einer Gesamtlaufzeit von 24 Stunden hatten die beiden ersten Glykosidonen, die die weitaus stärksten waren, die Säulen verlassen. wei schwache Zonen, die darauf folgten, wurden nicht mehr eluert.

ie erhaltenen Fraktionen wurden papierchromatographisch untercht. Zwischen den beiden Hauptzonen, die bereits auf der Säue sichtbar gewesen waren, fanden sich Mischfraktionen, die wei weitere Flavonglykoside enthielten. Sie wurden für eine eitere Fraktionierung abgetrennt.

ie reinen Fraktionen der beiden Hauptzonen wurden vereinigt nd im Vakuum eingedampft. Aus den aufgetrennten 45 g Flavonoidemisch wurden erhalten:

,5 g Rückstand von der zuerst durchgelaufenen schwächeren Hauptone. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser 1+1) ergaben sich 4,5 g eines feinen gelben Kristallisates, as im Vakuumexsikkator über Calciumchlorid getrocknet wurde. s konnte als Kämpferol-3-rhamnoglukosid identifiziert werden.

7,5 g Rückstand von der zweiten Hauptzone. Er wurde dreimal us Äthanol-Wasser (1+1) umkristallisiert und ergab nach dem rocknen 11,2 g eines feinen hellgelben Kristallisates, das t Kämpferol-3-glukosid identisch war.

Identifizierung von Kämpferol-3-rhamnoglukosid

s Schmelzintervall, bestimmt auf dem KOFLER-Heiztischmikrotop, lag bei 184 - 186° C. HÖRHAMMER und Mitarbeiter (22) gen ein Intervall von 182 - 185° C an.

e Rf-Werte bei der Papierchromatographie mit verschiedenen ufmitteln zeigten ebenfalls Übereinstimmung mit den Werten n HÖRHAMMER (absteigende Methode; Papier WHATMAN No 1):

tanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) Rf = 0,43

sigester-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) Rf = 0,45

Der Kristallwassergehalt wurde durch Konstanttrocknung der Substanz in der Trockenpistole über P_2O_5 bestimmt. Als Siedeflüssigkeit wurde Toluol, Kp. 110° C, verwendet.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage Auswaage	59,524 mg 53,579 mg	47,392 mg 42,511 mg
Verlust	5,945 mg = 10,0 %	4,881 mg = 10,3 %

Der mittlere Trocknungsverlust von 10,2 % stimmte mit dem von HÖRHAMMER gefundenen Wert von 4 Mol Kristallwasser überein.
Kämpferol-3-rhamnoglukosid $C_{27}H_{30}O_{15} \cdot 4\ H_2O$
Molgewicht 666,5; Kristallwassergehalt 10,6 %

Zur quantitativen Hydrolyse wurde das kristallwasserfreie Glykosid mit 5 %iger Schwefelsäure 2 Stunden im siedenden Wasserbad am Rückflusskühler erhitzt. Nach 1 Tag Stehen bei 0° C wurde das ausgefallene Aglukon auf einer Mikrofilternutsche G 3 gesammelt und nach Trocknung bei 120° C gewogen.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage (Glykosid)	53,579 mg	42,511 mg
Auswaage (Aglukon)	26,054 mg = 48,63 %	20,601 mg = 48,46 %

Der Mittelwert von 48,55 % Aglukon stimmte mit dem theoretischen Wert überein.
Kämpferol $C_{15}H_{10}O_6$; Molgewicht 286,2
Kämpferol-3-rhamnoglukosid $C_{27}H_{30}O_{15}$; Molgewicht 594,5
Aglukonanteil des Glykosids: 48,14 %

Das Aglukon Kämpferol wurde identifiziert durch
a) papierchromatographischen Vergleich
b) Schmelzpunktbestimmung.

a) Die im System Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) erhaltenen Flecken hatten den gleichen Rf-Wert von 0,9 wie Kämpferol, das aus dem Handel+ bezogen worden war.
b) Eine geringe Menge des Aglukons wurde in zwei Hohlschliffobjektträgern auf dem KOFLER-Heiztischmikroskop mikrosublimiert (31) und der Schmelzpunkt der erhaltenen Kristalle bestimmt. Das Schmelzintervall von 272 - 275° C zeigte Übereinstimmung mit der Literatur (29). Eine Mischprobe mit authentischem Kämpferol, das auf die gleiche Weise sublimiert worden war, ergab keine Depression des Schmelzpunktes.

Der Nachweis des Zuckeranteils wurde durch Hydrolyse des Glykosids und anschliessende Papierchromatographie des Hydrolysefiltrats erbracht. Eine Probe der Substanz wurde 30 Minuten mit 1 %iger Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Abfiltrieren des Aglukons wurde die Lösung mit Bariumcarbonat neutralisiert, wiederum filtriert und eingeengt. Diese Lösung liess bei der Papierchromatographie mit Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) und nach dem Behandeln mit Anilinphthalatlösung (43) drei verschiedene Zucker erkennen. An Hand von Vergleichssubstanzen wurden sie als Rhamnose (Rf-Wert 0,35), Glukose (Rf-Wert 0,18) und Rutinose (Rf-Wert 0,12) identifiziert. Die nicht im Handel erhältliche Rutinose wurde durch Säurehydrolyse von gereinigtem Rutin dargestellt. Sie wurde nicht isoliert, sondern im Gemisch mit Glukose und Rhamnose aufgetragen (22).

e) Identifizierung von Kämpferol-3-glukosid

Das Schmelzintervall wurde auf dem KOFLER-Heiztischmikroskop bestimmt; es lag bei dem aus Äthanol-Wasser (1+1) umkristallisierten Produkt zwischen 172 und 176° C. Bei Erhöhung der Temperatur erstarrte die Schmelze wieder und schmolz endgültig erst bei 218 - 220° C unter Rotfärbung. Kristallwasserfreies Glykosid sinterte bei 172 - 176° C lediglich etwas und schmolz bei 218 - 220° C.
Die aus Azeton-Wasser (1+1) kristallisierte Substanz hatte das

+ Firma Carl Roth, Karlsruhe

gleiche Schmelzintervall wie die aus Äthanol-Wasser erhaltene.

Papierchromatographisch verhielt sich die Substanz ebenso wie das von HÖRHAMMER beschriebene Kämpferol-3-glukosid. Als Rf-Werte wurden ermittelt (absteigende Methode; Papier WHATMAN No 1):

Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) Rf = 0,59
Essigester-Ameisensäure-Wasser (10+2+3) Rf = 0,64

Der Kristallwassergehalt wurde wie bei Kämpferol-3-rhamnoglukosid durch Trocknung bestimmt.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage Auswaage	42,185 mg 40,450 mg	40,130 mg 38,517 mg
Verlust	1,735 mg = 4,11 %	1,613 mg = 4,02 %

Als Mittelwert ergab sich ein Verlust von 4,07 %, entsprechend einem Gehalt von 1 Mol Kristallwasser.
Kämpferol-3-glukosid $C_{21}H_{20}O_{11}$. 1 H_2O; Molgewicht 466,41
Kristallwassergehalt 3,86 %

Die Kristallwasserbestimmung der aus Azeton-Wasser (1+1) erhaltenen Substanz ergab entsprechende Werte:

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage Auswaage	65,382 mg 62,727 mg	51,982 mg 49,918 mg
Verlust	2,655 mg = 4,06 %	2,064 mg = 3,97 %

Die quantitative Hydrolyse wurde mit 5 %iger Schwefelsäure, wie bei Kämpferol-3-rhamnoglukosid beschrieben, durchgeführt. Es wurde die kristallwasserfreie Substanz verwendet.

	1. Versuch	2. Versuch
Einwaage (Glykosid)	40,450 mg	38,517 mg
Auswaage (Aglukon)	25,771 mg = 63,71 %	24,662 mg = 64,03 %

Der Mittelwert von 63,87 % stimmte mit dem berechneten Aglukonanteil überein.

Kämpferol $C_{15}H_{10}O_6$; Molgewicht 286,2

Kämpferol-3-glukosid $C_{21}H_{20}O_{11}$; Molgewicht 448,4

Aglukonanteil des Glykosids: 63,83 %

Das bei der Hydrolyse ausgefallene Aglukon wurde, wie bei Kämpferol-3-rhamnoglukosid beschrieben, als Kämpferol identifiziert. Sowohl bei der Papierchromatographie als auch beim Schmelzpunktsvergleich verhielt sich die Substanz wie authentisches Kämpferol.

Der Zuckeranteil wurde papierchromatographisch nachgewiesen. Das Hydrolysefiltrat wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert und nach dem Filtrieren eingeengt. Bei der Papierchromatographie dieser Lösung mit Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) konnte nach Behandlung mit Anilinphthalatlösung lediglich ein Fleck gefunden werden. Seine Farbe und der Rf-Wert von 0,18 entsprachen den Eigenschaften mitgelaufener Glukose.

2. Ferment und Pufferlösungen

Für die Oxydationsversuche wurde ein gereinigtes Trockenpräparat von Meerrettich-Peroxydase[+] verwendet. Die Aktivitätsbestimmung dieser Peroxydase wurde nach der von CHANCE und MAEHLY (5) beschriebenen Guajakolmethode durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf der Bildung eines Gemisches oxydierter Tetrahydroxydiphenylderivate (52) bei der Einwirkung von Peroxydase-H_2O_2 auf Guajakol. Es kommt zu einer Erhöhung der Extinktion im Maximum dieser Produkte (470 nm), die im Spektralphotometer gemessen wird. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen ist die Geschwindigkeit der Extinktionserhöhung proportional der Aktivität des Fermentes. Bei Kenntnis der Geschwindigkeitskonstante reiner Peroxydase lässt sich die Fermentkonzentration der Lösung und damit die vorhandene Fermentmenge berechnen.
Aus mehreren Messungen ergab sich ein durchschnittlicher Gehalt der verwendeten Fermentpräparation von

$6{,}9 \cdot 10^{-9}$ Mol aktiver Peroxydase / 1 mg Trockensubstanz.

Sowohl für die spektrophotometrischen als auch für die papierchromatographischen und präparativen Versuche wurden frisch bereitete Lösungen der Peroxydase verwendet. 10 mg Ferment wurden zu 10 ml in bidestilliertem Wasser gelöst.

Für die Pufferlösungen wurde ein Natriumphosphat-Zitronensäure-Puffer (44) benutzt, der durch Mischen bestimmter Volumina einer 0,4-molaren Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$)-Lösung mit einer 0,2-molaren Zitronensäurelösung bereitet wurde. In Abwandlung der Originalvorschrift wurde die Konzentration beider Lösungen doppelt so gross wie angegeben gewählt, um den Zusatz der Flavonlösung und der Wasserstoffperoxydlösung zu ermöglichen. Nach Erreichen des Verdünnungsverhältnisses 1+1 besassen die Lösungen den gewünschten pH-Wert, wie Prüfungen mit der Glaselektrode bestätigten.

[+] Meerrettich-Peroxydase der Firma C.F. Boehringer u. Söhne GmbH, Mannheim

Das zum Bereiten der Lösungen usw. verwendete Wasser wurde über eine Mischbett-Ionenaustauscheranlage entmineralisiert und anschliessend in einer Quarzapparatur destilliert.

3. Die Oxydation von Kämpferol-3-glukosid durch Meerrettich-Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

Die Oxydationsversuche, deren Verlauf spektralphotometrisch gemessen werden sollte, wurden in 100 ml-Messkolben angesetzt. Die Konzentration des Kämpferol-3-glukosids betrug 5 µMol/100 ml Reaktionslösung; dabei lagen die mittleren Extinktionen der Lösungen im empfindlichsten Messbereich des Spektralphotometers, und auch die Maxima konnten noch gut ausgemessen werden.

a) Kämpferol-3-glukosidlösung

Da die Substanz in Wasser nur sehr schwer in Lösung zu bringen war, wurde eine konzentrierte Lösung in Methanol bereitet und mit Wasser verdünnt. Die dadurch in den Ansätzen vorhandene geringe Methanolmenge von 0,8 % störte die Fermentaktivität nicht.
58,30 mg Kämpferol-3-glukosid (= 125 µMol) wurden zu 20 ml in Methanol p.a. im Messkölbchen gelöst. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 2 ml (= 12,5 µMol) zu 50 ml Wasser verdünnt (wässerige Stammlösung).
20 ml wässeriger Stammlösung, entsprechend 5 µMol Kämpferol-3-glukosid, wurden für einen 100 ml-Reaktionsansatz verwendet.

b) Wasserstoffperoxydlösung

Zur Verwendung gelangte analysenreines, etwa 30 %iges Wasserstoffperoxyd. Durch Verdünnen dieser Lösung im Verhältnis 2,8 g/250 g Wasser wurde eine etwa 1/10 molare Lösung hergestellt, deren genauer Gehalt jodometrisch bestimmt wurde. Mit Wasser wurde die Lösung dann auf genau 1/10-Molarität eingestellt und als Stammlösung verwendet. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank war sie mehrere Wochen ohne Wirkungsverlust haltbar. Für die Reaktionsansätze wurde die Stammlösung jeweils im Verhältnis 5:1000 verdünnt; die dabei entstehende 1/1000 normale Lösung enthielt in 5 ml 2,5 µMol H_2O_2. Diese Menge entspricht 1 Oxydationsäquivalent, bezogen auf 5 µMol Kämpferol-3-glukosid.

c) Das Spektralphotometer

Die photometrischen Messungen wurden mit einem Spektralphotometer der Firma Carl Zeiss, Modell PMQ II, durchgeführt. Um einwandfreie Ergebnisse auch im Ultraviolettbereich zu erhalten, wurden durchweg Küvetten aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.
Die Vergleichsküvetten wurden jeweils mit einer der Messlösung entsprechenden Blindlösung gefüllt, der nur die zu messende Substanz nicht zugesetzt war.
Alle Messungen wurden bei 25° C durchgeführt; sowohl die Lösungen als auch das Küvettengehäuse des Spektralphotometers wurden mit einem Thermostaten auf diese Temperatur gebracht.

d) Spektren

Für das Spektrum in Methanol wurde die methanolische Stammlösung des Kämpferol-3-glukosids mit analysenreinem Methanol soweit verdünnt, dass die Konzentration 5 µMol Glykosid/100 ml betrug.
Die Glykosidlösungen in verschiedenen Puffern wurden bereitet, indem 20 ml wässerige Stammlösung mit 50 ml konzentrierter Pufferlösung versetzt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt wurden.

e) Oxydationsversuche

Zu jeweils 100 ml gepufferter und mit der erforderlichen Menge H_2O_2-Lösung versetzter Kämpferol-3-glukosidlösung wurden 0,1 ml Peroxydaselösung gegeben und durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Möglichst schnell wurde dieses Reaktionsgemisch in die Küvetten gefüllt und im Spektralphotometer gemessen. Die Reaktionszeiten wurden vom Zeitpunkt der Fermentzugabe an gerechnet; sie wurden mit der Stoppuhr gemessen.

f) Reduktionsversuche

44,0 mg Ascorbinsäure, entsprechend 250 µMol, wurden zu 100 ml Wasser gelöst. Bezogen auf 5 Oxydationsäquivalente Wasserstoff-

peroxyd (= 12,5 µMol) entspricht diese Konzentration einem 20-fachen Überschuss an Reduktionsmittel. Je 3 ml dieser Lösung wurden in Reagenzgläser gefüllt.
Dann wurde das Ferment zu der vorher bereiteten Oxydationslösung gegeben und die Reaktion eingeleitet. In Abständen von 20 Sekunden, nach 10 Minuten Reaktionsdauer in Abständen von 60 Sekunden, wurden dem Reaktionsgemisch Proben von 3 ml entnommen und in die Gläser mit Ascorbinsäurelösung gefüllt. Nach Beendigung der Oxydation wurden die reduzierten Proben bei 345 nm (pH 6) oder 350 nm (pH 7) auf ihre Extinktion untersucht. Der Ascorbinsäurezusatz hatte den pH-Wert der Lösungen, wie Messungen ergaben, nicht merklich verändert.

4. Papierchromatographie der Oxydationsprodukte

Es wurde nach der absteigenden Methode in Ganzglaskammern (6) chromatographiert. Als Papier wurde WHATMAN No 1 verwendet.

Nach dem Auftragen wurden die Papierbögen zum Äquilibrieren mindestens 5 Stunden in der lösungsmittelgesättigten Kammer belassen. Dann wurde mit dem einphasigen PARTRIDGE-Gemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+1) über 15 Stunden entwickelt.

Die Flecken waren grösstenteils schon im Tageslicht zu erkennen. Besser sichtbar wurden sie unter einer UV-Lampe, besonders nach Behandlung mit 3 %iger methanolischer Aluminiumchloridlösung. Da andere Sprühreagenzien keine wesentlich besseren Ergebnisse brachten, beschränkten wir uns auf diese Methode.

Reaktionsansätze:

Die Konzentration des Kämpferol-3-glukosids wurde so gewählt, dass in 0,1 ml Lösung 100 γ enthalten waren.
10 mg Glykosid (= 21,4 μMol) wurden in einem 10 ml-Messkölbchen in 1 ml Methanol gelöst. Dazu wurden 5 ml konzentrierte Pufferlösung und die entsprechende Menge Wasserstoffperoxydlösung gegeben und auf 10 ml aufgefüllt. Durch Fermentzusatz wurde dann die Reaktion eingeleitet.
Die Pufferlösungen waren die gleichen wie bei den spektrophotometrischen Versuchen.
Für die Wasserstoffperoxydlösung wurde die 1/10 molare Stammlösung im Verhältnis 21,4 ml:100 ml verdünnt; von dieser Lösung entsprachen 0,5 ml einem Oxydationsäquivalent.

Auf die Chromatogramme wurden pro Fleck 0,1 ml des Oxydationsgemisches aufgetragen, entsprechend 100 γ Kämpferol-3-glukosid. Das Auftragen geschah mit Hilfe eines Föhns in schonender Weise bei Temperaturen von etwa 30° C.

Zum Abstoppen der Reaktion nach bestimmten Zeiten wurde Kaliumcyanidlösung verwendet. 200 mg Kaliumcyanid (Molgewicht 65,1)

wurden zu 10 ml in Wasser gelöst. Von dieser 0,3 molaren Lösung wurden jeweils 0,1 ml mit 1 ml Reaktionslösung versetzt, so dass die Fermentinhibierung in etwa 0,03 molarer Lösung ablief.

5. Isolierung eines Oxydationsproduktes

a) Reaktionsansatz

5 g Kämpferol-3-glukosid wurden in Anteilen von je 1 g oxydiert. 1 g Glykosid wurde in 100 ml Methanol gelöst und mit 800 ml Wasser verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 50 ml Wasserstoffperoxydlösung - Konzentration: 21,4 ml 1/10 molare Stammlösung/100 ml Wasser -, entsprechend 1 Oxydationsäquivalent, und 50 ml Fermentlösung gegeben. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Schwenken gemischt und zur Reaktion 2 Stunden stehen gelassen.
Dann wurde die trübe gelbe Lösung im Vakuum bei 35° C zur Trockne eingedampft. Aus den 5 Ansätzen hinterblieben insgesamt 5 g eines bräunlich-gelben Rückstandes, der sehr hygroskopisch war.

b) Säulenchromatographie des Oxydationsgemisches

Die Vorversuche zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels wurden in kleinen Chromatographiesäulen von 2 cm Durchmesser und 40 cm Länge durchgeführt. Das Polyamidpulver (pp 15 Sp der Firma BASF) wurde in Wasser suspendiert, nach 24-stündigem Quellen in die Säule eingeschlämmt und zur Reinigung mit etwa 500 ml des entsprechenden Lösungsmittels gewaschen. Auf die mit einem Filterpapier bedeckte Polyamidschicht wurden dann 50 mg Oxydationsprodukt, gelöst in 5 - 10 ml Lösungsmittel, aufgetragen und die Säule entwickelt. Die bei der Chromatographie entstehenden Zonen wurden im Tageslicht und im UV-Licht beobachtet.

c) Reinigung von Tetrahydrofuran (3)

Tetrahydrofuran, das sich als sehr geeignetes Lösungsmittel für die Auftrennung der Oxydationsprodukte erwies, wurde für diesen Zweck besonders gereinigt. Das war notwendig, um die beim Abdampfen von Tetrahydrofuran leicht zurückbleibenden Schmieren zu vermeiden, aber auch, um eine oxydative Veränderung der isolierten Zwischenprodukte durch meist vorhandene Peroxyde zu verhindern.
1000 g Tetrahydrofuran des Handels wurden mit 4 g Kupfer(I)-

chlorid 30 Minuten am Rückflusskühler gekocht und dann über einen Fraktionieraufsatz destilliert. Der zwischen 66 und 68° C übergehende Anteil des Destillats wurde verwendet. Er war frei von Peroxyden, wie die Probe mit Vanadin-Schwefelsäure (7) bewies.

d) Präparative Auftrennung des Oxydationsgemisches

Chromatographiesäulen von 5 cm Durchmesser wurden in der beschriebenen Weise 20 cm hoch mit Polyamidpulver gefüllt und mit etwa 2 l Methanol-Tetrahydrofuranmischung (1+1) durchgewaschen. Dann wurden jeweils 350 mg Oxydationsgemisch, gelöst in 30 ml des Lösungsmittelgemisches, vorsichtig aufgetragen und chromatographiert. Wegen der sehr sauberen Trennung in die einzelnen Zonen wurde auf einen Fraktionssammler verzichtet und die Vorlagen mit der Hand gewechselt. So konnten gleichzeitig mehrere Säulen eluiert werden.
Die gesammelten Fraktionen des nicht oxydierten Kämpferol-3-glukosids und der Oxydationsprodukte wurden anschliessend in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei 35° C zur Trockne eingedampft.
Der Rückstand des mit Zone D bezeichneten Oxydationsproduktes wurde dreimal aus absolutem Äthanol umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator über Calciumchlorid ergaben sich 210 mg einer gelben glasartigen Substanz.

6. Untersuchung des Oxydationsproduktes

a) Schmelzpunktsbestimmung und Chromatographie

Die Schmelzpunkte des Oxydationsproduktes und seines Aglukons wurden auf dem KOFLER-Heiztischmikroskop bestimmt. Papierchromatographiert wurde nach der absteigenden Methode in Ganzglaskammern. Als Papier wurde WHATMAN No 1 verwendet.

Die dünnschichtchromatographischen Versuche wurden mit der "Grundausrüstung Nr. 600" der Firma Desaga (Heidelberg) durchgeführt. Adsorbens war das Polyamidpulver "Woelm" zur Dünnschichtchromatographie; es wurde als Chloroform-Methanol-Aufschlämmung auf die Glasplatten gestrichen.

b) Elementaranalyse

Eine Analyse des C- und H-Gehaltes des Oxydationsproduktes[+] ergab folgende Werte (nach Konstanttrocknung bei 80° C im Hochvakuum):

	Einwaage (mg)	CO_2 (mg)	H_2O (mg)	% C	% H
1. Probe	4,311	9,02	1,94	57,10	5,04
2. Probe	4,055	8,48	1,90	57,07	5,24
Mittelwert				57,08	5,14

Die theoretischen Werte von Kämpferol-3-glukosid sind folgende:
Kämpferol-3-glukosid $C_{21}H_{20}O_{11}$; Molgewicht 448,37
C-Gehalt: 56,25 % H-Gehalt: 4,50 %

c) Säurehydrolyse

Wegen der schlechten Löslichkeit des Oxydationsproduktes in

[+] durchgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr

wässerigen Säurelösungen wurde folgendermassen gearbeitet: 100 mg des Oxydationsproduktes wurden in 90 ml einer Mischung von Methanol und gereinigtem Tetrahydrofuran (1+1) gelöst. Dann wurde im Wasserbad am Rückflusskühler erwärmt und der siedenden Lösung 60 ml 5 %ige Schwefelsäure in kleinen Anteilen hinzugefügt. Nach zweistündiger Hydrolyse wurde der Rückflusskühler gegen eine Destillationsbrücke ausgetauscht und die organischen Lösungsmittel abdestilliert. Dabei schied sich das Aglukon allmählich in Form eines flockigen gelben Niederschlages ab. Es wurde nach 24-stündigem Stehen bei 0° C auf einer Mikrofilternutsche G 4 gesammelt und getrocknet.

d) UV-Spektren

1. Oxydationsprodukt und Aglukon. Die im Vakuum über P_2O_5 bei 100° C getrockneten Substanzen wurden in Methanol p.a. gelöst. Die Einwaagen entsprachen denen von getrocknetem Kämpferol-3-glukosid bzw. Kämpferol.

2. Aluminiumkomplexe. Jeweils 5 µMol der Flavone, bzw. deren Gewicht entsprechende Mengen der Oxydationsprodukte wurden zu 100 ml in Methanol p.a. gelöst.
1,8 g Aluminiumchlorid ($AlCl_3 \cdot 6\ H_2O$) wurden zu 100 ml in Methanol gelöst. 1 ml dieser Lösung enthielt 75 µMol $AlCl_3$. Zu 100 ml der Flavonlösung wurde 1 ml Aluminiumchloridlösung, entsprechend einem 15-fachen molaren Überschuss, hinzugegeben und gemischt; nach 60 Minuten Stehen wurden die Spektren gemessen.

e) Azetylierung des Aglukons

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Teil des Aglukons azetyliert. Um eine Zersetzung der Substanz zu vermeiden, wurde die schonende Methode von FISCHER und BERGMANN (10) angewendet.
50 mg Aglukon wurden in 6 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 8 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Mischung wurde 3 Stunden auf einer Temperatur von 50° C gehalten und darauf 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde durch langsa-

men Wasserzusatz (100 ml) das azetylierte Produkt ausgefällt. Nach dem Absaugen auf einer Mikrofilternutsche G 4 wurde es aus Eisessig-Wasser umkristallisiert. Die erhaltenen feinen Kristalle waren fast weiss und schmolzen zwischen 186 und 190° C unter Gelbfärbung (KOFLER).

f) Azetylgruppenbestimmung

Da eine Azetylgruppenbestimmung durch Verseifung bei Flavonoiden zu falschen Werten führen kann (51), wurde die C-Methylgruppenbestimmung nach KUHN und ROTH (33) angewendet. Sie ergab folgende Werte+ (nach Konstanttrocknung der Substanz bei 80° C im Hochvakuum):

	Einwaage (mg)	verbrauchte ml n/100 NaOH	% CH_3
1. Probe	5,400	4,05	11,27
2. Probe	1,547	1,21	11,76

g) Molgewichtsbestimmung nach RAST

Als Lösungsmittel wurde synthetischer Kampfer verwendet; unter Zusatz von etwas Äther wurde er fein verrieben und anschliessend an der Luft getrocknet.
In eine einseitig zugeschmolzene Glaskapillare von etwa 2 mm Durchmesser wurden 0,2 - 0,3 mg des Azetylprodukts eingewogen und eine etwa 10-fache Menge Kampfer hinzugefügt. Die Kapillare wurde wiederholt auf einer Glasplatte aufgestossen, um Substanz und Kampfer quantitativ am Boden des Gefässes zu sammeln. Anschliessend wurde sie 15 - 20 mm oberhalb des Bodens in der Sparflamme des Bunsenbrenners zugeschmolzen.
Substanz und Kampfer wurden durch kurzes Eintauchen der Kapillare in ein Schwefelsäurebad von 180° C zusammengeschmolzen.

+ Die Bestimmung wurde ausgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr.

Nach eintägigem Lagern bei Zimmertemperatur wurde der Schmelzpunkt im ROTH'schen Apparat, der auf etwa 150° C vorgeheizt war, bestimmt. Der Schmelzpunkt des reinen Kampfers wurde in ebenso grossen Kapillaren nach gleicher Vorbehandlung ermittelt.
Als molare Schmelzpunktsdepression des Kampfers wurde bei der Berechnung der Wert von 39,7° zugrunde gelegt (48).

	Einwaage (Substanz)	Einwaage (Kampfer)	Schmelzpunkts-depression	Errechnetes Molgewicht
Versuch 1	0,272 mg	2,109 mg	6,0°	853
Versuch 2	0,296 mg	3,860 mg	4,0°	761
Versuch 3	0,365 mg	3,356 mg	5,5°	785

Als Mittelwert der drei Bestimmungen ergibt sich ein Molgewicht von 800.

h) Molgewichtsbestimmung mit dem Osmometer

Als Lösungsmittel wurden Pyridin und Methyläthylketon verwendet. Für jedes dieser Lösungsmittel wurde mit Hilfe von Benzil, einer Substanz von bekanntem Molekulargewicht, eine Eichkurve aufgestellt. Dazu wurden Lösungen verschiedener Konzentration bereitet und die gegen das reine Lösungsmittel auftretenden Temperaturdifferenzen im Osmometer gemessen. In Abhängigkeit von der Molarität der Lösungen aufgetragen, ergaben diese Werte eine Eichgerade für das betreffende Lösungsmittel.
Darauf wurden Lösungen des Azetylprodukts bereitet und deren Temperaturdifferenzen gegenüber den reinen Lösungsmitteln gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnten aus diesen Werten die molaren Konzentrationen und damit die Molekulargewichte berechnet werden.
Es ergaben sich folgende Werte:
1. Lösungsmittel Pyridin: 857 (Mittelwert aus 6 Einzelmessungen)
2. Lösungsmittel Methyläthylketon: 807 (Mittelwert aus 4 Einzelmessungen)

i) Alkalischmelze des Oxycationsproduktes

Die Alkalischmelze wurde nach einer von HÖRHAMMER und Mitarbeitern (23) beschriebenen Methode durchgeführt.
Etwa 1 g Kaliumhydroxyd wurde in einem Reagenzglas auf der Sparflamme des Bunsenbrenners geschmolzen, mit 5 mg des fein verriebenen Oxydationsproduktes versetzt und 5 Minuten lang bei Schmelztemperatur gehalten.
Nach dem Abkühlen wurde die erstarrte gelbbraune Schmelze in wenig Wasser gelöst und mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Das Gemisch wurde in einen Scheidetrichter gespült und viermal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherauszüge wurden auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand zur Chromatographie in wenig Methanol gelöst.

Die Spaltprodukte wurden dünnschichtchromatographisch an Zelluloseschichten+ getrennt. Als Laufmittel fanden folgende Gemische Verwendung:
Benzol-Propionsäure-Wasser (2+2+1),
Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5),
Chloroform-Eisessig-Wasser (13+6+1).

p-Oxybenzoesäure und Phlorogluzin wurden durch Besprühen mit diazotierter Sulfanilsäure (17) sichtbar gemacht.

+ Zellulosepulver 300 zur Dünnschichtchromatographie, Fa. Macherey, Nagel & Co, Düren

E. Zusammenfassung

Das Verhalten von Kämpferolglykosiden gegenüber dem Fermentsystem Meerrettich-Peroxydase und Wasserstoffperoxyd sollte untersucht werden. Dazu wurden Kämpferol-3-glukosid und Kämpferol-3-rhamnoglukosid aus den getrockneten Blüten von Aesculus Hippocastanum L. isoliert. Die Darstellung der beiden Glykoside erfolgte in guter Ausbeute und Reinheit durch Säulenchromatographie an Polyamidpulver.
Für die Versuche wurde das in grösserer Menge erhaltene Kämpferol-3-glukosid verwendet. Es wurde in wässerigen Lösungen des pH-Bereiches 3 bis 7 mit Peroxydase-H_2O_2 behandelt und die auftretenden Veränderungen spektralphotometrisch und papierchromatographisch verfolgt. Auffällig war die starke pH-Abhängigkeit der Reaktion; während sich Lösungen vom pH 3 auch nach längerer Zeit nicht veränderten, traten vor allem bei pH 6 und pH 7 erhebliche Oxydationserscheinungen auf. Die Spektren dieser Lösungen verloren ihre scharf ausgeprägten Maxima und Minima und zeigten in ihrem gesamten Verlauf eine Nivellierung, deren Umfang von der Menge des zugesetzten Wasserstoffperoxydes und der Einwirkungszeit des Fermentes abhängig war. Zusatz eines Reduktionsmittels zu den oxydierten Ansätzen bewirkte keine messbare Rückbildung der ursprünglichen Spektren.
Die papierchromatographischen Untersuchungen zeigten, dass sich bei der Oxydation mehrere Produkte bildeten, die durchweg geringere Rf-Werte als Kämpferol-3-glukosid besassen oder aber am Startpunkt verblieben. Dieses Verhalten sowie Farbe und Löslichkeitseigenschaften wiesen auf polymere Verbindungen hin. Mit steigender Wasserstoffperoxydmenge und zunehmender Oxydationszeit verringerte sich der Anteil der Produkte von mittlerem Rf-Wert, während der Anteil der am Startpunkt verbleibenden Polymeren zunahm.
Ein Reaktionsprodukt von mittlerem Rf-Wert fiel durch seine Menge vor allem bei der Oxydation mit wenig Wasserstoffperoxyd auf. Es konnte bei der Oxydation von mehreren Gramm Kämpferol-3-glukosid durch Polyamidchromatographie in geringer Menge isoliert werden. Die Molekulargewichtsbestimmung nach zwei verschiedenen Methoden erbrachte den Beweis für ein dimeres Kämp-

ferol-3-glukosid. In den UV-Spektren unterschied sich dieses Produkt nicht wesentlich vom Kämpferol-3-glukosid. Auch die Spektren seines Aglukons und des Kämpferols stimmten miteinander überein.
In welcher Stellung die beiden Kämpferol-3-glukosid-Moleküle beim Dimeren verknüpft sind, liess sich wegen der geringen Menge nicht klären. Die Hydroxylgruppenbestimmung ergab Anhaltspunkte für eine Sauerstoffbrückenbindung zwischen den Monomeren.
Abschliessend wurden der Reaktionsmechanismus des Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Systems sowie die Polymerisationsmöglichkeiten der bei Einwirkung auf Phenole gebildeten Radikalstrukturen erörtert. Beim Vergleich mit den eigenen Versuchsergebnissen ergab sich Übereinstimmung mit den bereits bekannten Reaktionsabläufen.

F. Literaturverzeichnis

1) BAKER, W. und W.D. OLLIS in "Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds", S. 152, herausgegeben von W.D. Ollis, Pergamon Press, Oxford (1961)
2) BARTON, D.H.R. und T. COHEN in "Festschrift Arthur Stoll", S. 117, Birkhäuser-Verlag, Basel (1957)
3) BUNGE, W. in Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", 4. Aufl., Bd. I/2, S. 814, herausgegeben von E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
4) BURRIS, R.H. in "Handbuch der Pflanzenphysiologie", Bd. XII/1, S. 367, herausgegeben von W. Ruhland, Springer-Verlag, Berlin (1960)
5) CHANCE, B. und A.C. MAEHLY in "Methods of Enzymology", Bd. II, S. 770, herausgegeben von S.P. Colowick und H.O. Kaplan, Academic Press, New York (1955)
6) CRAMER, F., "Papierchromatographie", 2. Aufl., S. 31, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1953)
7) DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 6. Ausgabe, S. 418, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1953)
8) EGGER, K., Z. analyt. Chem. 171, 96 (1959)
9) ERDTMAN, H. und C.A. WACHTMEISTER in "Festschrift Arthur Stoll", S. 144, Birkhäuser-Verlag, Basel (1957)
10) FISCHER, E. und M. BERGMANN, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 50, 1048 (1917)
11) FREUDENBERG, K., Experientia 16, 101 (1960)
12) FREUDENBERG, K. und I.M. ALONSO DE LAMA, Ann. Chem. 612, 78 (1958)
13) FUKUI, T., Yakugaku Zasshi 80, 756 (1960), ref. nach C.A. 54, 24 699 (1960)
14) GEISSMAN, T.A. in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", S. 1, herausgegeben von T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford (1962)
15) GEISSMAN, T.A. in "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. III, S. 450, herausgegeben von K. Paech und M.V. Tracey, Springer-Verlag, Berlin (1955)
16) GROSS, A.I. und I.W. SIZER, J. Biol. Chem. 234, 1611 (1959)
17) HAIS, I.M. und K. MACEK, "Handbuch der Papierchromatographie" Bd. I, S. 743, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1958)

18) HATHWAY, D.E. und I.W.T. SEAKINS, Biochem. J. 67, 239 (1957)
19) HATTORI, S. in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", S. 317, herausgegeben von T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford (1962)
20) HECKER, E. und P. KARLSON, Chemie-Ing.-Techn. 25, 397 (1953)
21) HERGERT, A.L. in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", S. 553, herausgegeben von T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford (1962)
22) HÖRHAMMER, L., H.I. GEHRMANN und L. ENDRES, Arch. Pharm. 292, 113 (1959)
23) HÖRHAMMER, L., L. STICH und H. WAGNER, Arch. Pharm. 294, 685 (1961)
24) HÖRHAMMER, L. und H. WAGNER, Pharm. Ztg. 104, 783 (1959)
25) HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und F. FÖCKING, Arch. Pharm. 293, 1001 (1960)
26) HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und W. LEEB, Naturwiss. 44, 513 (1954)
27) JURD, L. in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", S. 107, herausgegeben von T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford (1962)
28) JURD, L. und R.M. HOROWITZ, J. Org. Chem. 22, 1618 (1957)
29) KARRER, W., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, S. 601, Birkhäuser-Verlag, Basel (1958)
30) KISHIMOTO, Y., J. Pharm. Soc. Japan 76, 250 (1956), ref. nach C.A. 50, 13 894 (1956)
31) KOFLER, L. und A., Thermo-Mikromethoden, S. 18, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1954)
32) KOLESNIKOW, P.A. und E.I. PETROCHENKO, Doklady 127, 223 (1959), engl. Übersetzung
33) KUHN, R. und H. ROTH, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 1274 (1933)
34) LOTH, H., Arch. Pharm. 294, 419 und 498 (1961); 295, 161 (1962)
35) MASON, H.S., Advanc. Enzymol. 19, 79 (1957)
36) E. MERCK AG, Chromatographie (Firmenschrift), 2. Aufl., S. 29, Darmstadt
37) MIKHAILOV, M.K., Doklady 121, 511 (1958), engl. Übersetzung
38) MÜNZEL, K., I. BÜCHI und O.E. SCHULTZ, Galenisches Praktikum, S. 196, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1959)
39) MYRBÄCK, K., in "Fermente - Hormone - Vitamine", 3. Aufl., S. 483, herausgegeben von R. Ammon und W. Dirscherl, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)

40) NAKABAYASHI, T., J. Agric. Chem. Soc. Japan 26, 539 (1952), ref. nach C.A. 48, 5 942 (1954)
41) NEU, R., Arch. Pharm. 293, 169 (1960)
42) NEUBERG, C. und M. KOBEL, Naturwiss. 23, 800 (1935)
43) PARTRIDGE, S.M., Nature (London) 164, 443 (1949)
44) PERELMAN, W.I., Taschenbuch der Chemie, 2. Aufl., S. 843, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1959)
45) PESTEMER, M. und D. BRÜCK in Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", 4. Aufl., Bd. III/2, S. 749, herausgegeben von E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
46) PONTING, I.D. und M.A. JOSLYN, Arch. Biochem. 19, 47 (1948)
47) PREGL, F., Die quantitative organische Mikroanalyse, 3. Aufl., Berlin (1930); zit. nach "Die Methoden der Fermentforschung", Bd. I, S. 715, herausgegeben von E. Bamann und K. Myrbäck, Georg Thieme Verlag, Leipzig (1941)
48) RAST, K., in Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", 4. Aufl., Bd. III/1, S. 365, herausgegeben von E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
49) ROBERTS, E.A.H., in "The Chemistry of Flavonoid Compounds", S. 468, herausgegeben von T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford (1962)
50) ROLLER, K., Z. Botan. 44, 477 (1956)
51) ROTH, H. in Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", 4. Aufl., Bd.II, S. 351, herausgegeben von E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
52) SAUNDERS, B.C., Roy. Inst. Chem. (London), Lectures, Monographs and Reports 1, 559 (1957)
53) ULLMANNs Encyklopädie der technischen Chemie, 3. Aufl., Bd. XI S. 41, herausgegeben von W. Foerst, Verlag Urban und Schwarzenberg, München (1960)
54) VENKATARAMAN, K. in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Bd. XVII, S. 1, herausgegeben von L. Zechmeister, Springer-Verlag, Wien (1959)
55) WAGNER, H., L. HORHAMMER und W. KIRCHNER, Arch. Pharm., 293, 1053 (1960)
56) WESTERFELD, W.W. und G. LOWE, J. Biol. Chem. 145, 463 (1942)
57) ZEILE, K. in "Die Methoden der Fermentforschung", Bd. III, S. 2603, herausgegeben von E. Bamann und K. Myrbäck, Georg Thieme Verlag, Leipzig (1941)

L e b e n s l a u f

Am 30. Juni 1935 wurde ich als Sohn des Zahlmeisters Heinrich Klinge und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Dägler, in Berlin geboren.
Von 1941 bis 1946 besuchte ich die Volksschule, zuerst in Teltow bei Berlin, darauf in Wanfried/Werra und Friedrichroda (Thüringen). 1946 wurde ich auf den altsprachlichen Zweig des Goethe-Gymnasiums in Berlin-Wilmersdorf umgeschult und bestand dort im Frühjahr 1954 das Abitur.
Von April 1954 bis März 1956 war ich Praktikant in der Pestalozzi-Apotheke, Berlin-Charlottenburg. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung begann ich im Mai 1956 das Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin. Im Mai 1959 bestand ich die pharmazeutische Prüfung. Ich arbeitete zunächst als Kandidat der Pharmazie in der Pestalozzi-Apotheke, Berlin-Charlottenburg. Am 11. Mai 1960 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.
Im Juni 1959 begann ich bei Herrn Prof. Dr. G. Schenck mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Seit Oktober 1960 war ich daneben als wissenschaftlicher Assistent am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin tätig.